22101780006

Med
K16113

/ 6/1/4/162

WELLCOME INSTITUTE
LIBRARY

Coll.	welMOmec
Call No.	GW

42550

11129

LES

MICROORGANISMES

DE LA

FERMENTATION

ENCYCLOPÉDIE DES CONNAISSANCES PRATIQUES

NOUVELLE COLLECTION

de volumes in-16, comprenant 300 pages, illustrés de figures, **3** *fr.* **50** *le volume broché, et* **4** *fr. cartonné.*

BOURQUELOT (Émile), docteur ès-sciences, professeur agrégé à l'école supérieure de pharmacie de Paris, pharmacien en chef de l'hôpital Laënnec. — **Les Fermentations**, 1 volume illustré de 21 figures intercalées dans le texte, cartonné . . . . . 4 fr.

CANCALON (le Dr A.-A.). — **L'Hygiène nouvelle dans la Famille.** Préface du Dr DUJARDIN-BEAUMETZ, membre de l'Académie de médecine. Deuxième édition augmentée. 1 volume cartonné. Prix . . . . . 4 fr.

DEBAINS (Alfred), Ingénieur des Arts et Manufactures, Professeur de Génie rural à l'École Nalionale d'agriculture de Grand Jouan. — **Instruction pratique sur l'utilité et l'emploi des machines agricoles sur le terrain.**

Trois volumes: le premier sur les *Semailles*; le second sur les *Labours*; le troisième sur les *Récoltes,* in-8° carré, avec figures et clichés de machines. Chaque volume cartonné. Prix. 4 fr.

FABIUS DE CHAMPVILLE (G.), Chevalier du Mérite agricole, chroniqueur scientifique de la Presse parisienne. **Comment on obtient le bon cidre**, manuel du cultivateur et du fabricant de cidre. 1 vol. grand in-8, avec figures dans le texte, broché. . . . . 3 fr. 50
cartonné. . . . . 4 fr.

LARBALÉTRIER (Albert), Professeur à l'École d'Agriculture du Pas-de-Calais. — **Les grandes Cultures de la France.** 1 volume de 360 pages, cartonné. Prix . . . . . 4 fr.

MAUMENÉ (E.-J.), Docteur ès-sciences, lauréat de l'Institut. **Comment s'obtient le Bon Vin**, 1 volume in-8° avec 51 figures dans le texte, cartonné. Prix . . . . . 4 fr.

MARTIN (Ch.-J.), Ingénieur Agronome, Directeur de l'École Nationale de l'Industrie Laitière de Mamirolle (Doubs). — **L'Industrie du Gruyère**, 1 volume in-8° avec figures et plans dans le texte, cartonné. Prix . . . . . 4 fr.

PRÉFACE

Le présent livre est un exposé de la morphologie et de la biologie des microorganismes qui se présentent dans les fermentations. Il forme donc, en quelque sorte, un supplément aux ouvrages qui s'occupent principalement de la partie chimique du sujet.

Je me suis proposé de donner, *sous une forme claire et précise, un aperçu général des connaissances acquises dans tout le domaine en question*, en tenant compte des différentes méthodes d'investigation qui, par la suite, sont devenues importantes.

Lorsqu'il est question des organismes de la fermentation et du rôle qui leur revient dans l'industrie, deux savants attirent tout particulièrement notre attention, à savoir Pasteur, au début de la littérature, et Hansen, dans la littérature moderne. Mon livre ayant, avant tout, pour but de traiter de *l'état actuel de la science*, les travaux du laboratoire de Carlsberg sont naturellement appelés à prendre une large place dans cet exposé. Ainsi les chapitres V et VI contiennent une description exacte des recherches théoriques de Hansen sur les ferments al-

cooliques, de ses méthodes pour la culture pure et l'analyse de la levure alcoolique, ainsi qu'un aperçu sur l'emploi pratique de son système de purification de la levure, et sur les résultats obtenus par cette voie dans les brasseries, distilleries et fabriques de levure pressée, dans la fermentation du vin de raisin et de fruits.

Ce livre s'adresse par conséquent tant aux chimistes, botanistes et biologistes, qu'aux ingénieurs qui s'occupent de ces branches de l'industrie.

Dans l'énumération de la littérature, j'ai donné un aperçu sur tous les ouvrages importants pouvant intéresser l'homme de science et le technicien.

Dans sa forme actuelle, le livre a, au point de vue de la matière, la même extension et la même somme de données que la 3me édition allemande, entiérement remaniée et la nouvelle édition anglaise (1893).

ALFRED JOERGENSEN.

Copenhague, Janvier 1894.

CHAPITRE PREMIER

RECHERCHES MICROSCOPIQUES ET PHYSIOLOGIQUES

I. — Préparations microscopiques. — Colorations et analyses microchimiques.

Le *microscope* sera toujours le principal auxiliaire dans l'étude des microorganismes, ceux-ci étant, à l'état d'individu, presque toujours invisibles à l'œil nu. C'est aux recherches purement microscopiques que nous devons les premières observations importantes sur la physiologie de la fermentation, et il n'y a que quelques dizaines d'années que les études biologiques et physiologiques s'y associèrent. Après que l'on eut établi avec une certaine probabilité, qu'une même espèce de microorganismes ne se produisait pas toujours sous la même forme, un travail actif commença dans différents laboratoires, avec ce que l'on est convenu d'appeler des «*essais de culture*». En modifiant artificiellement les conditions d'existence, on s'efforça d'étudier les différents degrés de développement d'une même espèce, afin d'en déterminer toutes les phases. L'idée était juste, mais l'exécution tellement défectueuse à cette époque, que les «*essais de culture*» risquèrent de tomber complètement en défaveur. On opérait sans aucune critique, comme le montre l'exemple suivant: on sema de la levure de bière sur une tranche de pain humide, puis on couvrit soigneusement la culture d'une

cloche en verre, en prenant toutes les précautions possibles pour garantir la végétation de tout corps étranger. Au bout de quelques jours il se forma, comme cela a toujours lieu sur du pain humide, un couche de moisissures et l'on en conclut que la levure de bière était le point de départ des formes de moisissures et que par conséquent, la levure et les moisissures ne représentaient que différentes étapes dans le développement d'une seule et même espèce.

Il se passa plusieurs années avant que l'on comprît, ce qui aujourd'hui paraît tout naturel, qu'il est absolument indispensable, dans ce genre d'études, de se fixer exactement sur le *point de départ*, avant de procéder à aucune conclusion quelconque. Cette nécessité fut de plus en plus reconnue et nous verrons que l'on a réussi, dans le domaine qui nous occupe, à obtenir un degré de perfection plus élevé que dans les branches voisines de la science.

Pour l'étude des microorganismes, il sera généralement nécessaire d'employer un microscope d'un grossissement de mille fois. En ce qui concerne la levure et les moisissures, toute la préparation se réduit ordinairement à porter une goutte du liquide, dans lequel se trouvent les organismes, sur le porte-objet et de l'étendre en une couche mince au moyen du couvre-objet. S'ils ont été cultivés dans un milieu nourricier solide, on en délayera préalablement une très petite quantité dans une goutte d'eau. L'examen des bactéries doit, en tous cas, toujours commencer par cette opération. Dans l'étude moderne des bactéries et notamment dans celle des formes pathogéniques, on emploie un grand nombre de *méthodes de dessiccation* et *de coloration*, tant pour faciliter les observations que pour donner naissance à des caractères qui, sans cela, ne pourraient être observés que difficilement, à supposer qu'ils puissent même l'être. A ces méthodes, on fit l'ob-

jection sans doute justifiée que ce traitement altérait souvent chez les bactéries certaines proportions, telles que celles de la longueur et de l'épaisseur, par exemple. D'un autre côté, il faut appuyer sur le fait, surtout en ce qui concerne certaines formes pathogéniques telles que le *bacille de la tuberculose*, que, conformément aux observations de Koch, ce ne fut qu'une préparation de ce genre qui rendit possible la détermination certaine de ces organismes, et qu'une coloration est souvent indispensable pour découvrir les bacilles. A titre d'exemple pour les méthodes de coloration, examinons de plus près l'étude du bacille de la tuberculose, qui conduisit à une des observations les plus importantes de la médecine moderne. Koch indiqua la manière suivante : la tranche du tissu contenant les bacilles est immergée pendant 24 heures dans un mélange de 200 parties d'eau distillée, 1 partie de solution alcoolique concentrée de bleu de méthylène et de 0, 2 parties de potasse caustique en solution à 10 p. cent. Ce traitement la teint en bleu foncé et on la met ensuite pendant 15 minutes dans une solution aqueuse concentrée de vésuvine. Ensuite on la rince avec de l'eau distillée jusqu'à ce que la couleur bleue disparaisse en faisant place à une teinte plus ou moins brune ; enfin on déshydrate avec de l'alcool, on clarifie avec de l'huile de girofle, et la tranche se trouve ainsi prête pour l'examen microscopique. Les noyaux des cellules et la plupart des microcoques sont alors teints en brun, tandis que les bacilles de la tuberculose apparaissent d'un bleu intense. (De tous les bacilles connus il n'y a que celui de la lèpre qui se comporte d'une façon analogue, mais il se distingue sous d'autres rapports, de celui de la tuberculose.) D'après Koch la réaction alcaline de la solution colorante était essentielle, car ces bacilles ne se colorent jamais dans des liqueurs acides ou neutres ; la solution neutre d'une autre matière colorante fait toujours dispa-

raître la première coloration, excepté pour les bacilles de la tuberculose qui la conservent. — De toutes les méthodes proposées plus tard pour reconnaître ces microorganismes, c'est celle d'Ehrlich qui fut reconnue la plus parfaite. A la place de la potasse, il se servit de l'aniline, un liquide oléagineux, légèrement jaunâtre, qui, en solution aqueuse, a la propriété d'absorber plus de matière colorante que la potasse caustique. En outre, il employa pour la décoloration, des acides minéraux, partant de la supposition que les bacilles de la tuberculose étaient entourés d'une enveloppe ne laissant pénétrer que des liquides alcalins. Si donc les bacilles, les noyaux cellulaires, le protoplasma, etc., sont susceptibles de coloration par la solution alcaline, et si les premiers sont par conséquent difficiles à trouver dans ce mélange, un acide détruira la couleur dans toutes les autres parties et dans tous les autres microorganismes étrangers; mais comme l'enveloppe présumée des bacilles de la tuberculose est imperméable pour des acides, ceux-ci resteront comme seuls corps colorés dans toute la préparation. Ehrlich pratique la coloration de la manière suivante: du violet de gentiane réduit en poudre fine est dissous daus une solution aqueuse d'aniline complètement saturée. On filtre 10 à 20 gouttes de cette solution dans un verre de montre, et l'on y laisse reposer la tranche à examiner pendant à peu près 24 heures, après quoi on la rince dans de l'eau distillée pour la replacer ensuite dans le verre de montre, dans un mélange de, par exemple, 3 parties d'acide nitrique et de 100 parties d'alcool. Au bout de 3 à 5 minutes, la tranche se trouve décolorée, on la met dans de l'alcool et enfin on l'examine dans de l'huile de girofle.

Il est connu que dans les derniers temps, l'on s'est souvent servi de reproductions photographiques de bactéries, introduites premièrement par Koch. Pour les préparer, les colorations et les décolorations sont absolument indispen-

sables, d'une part pour faire ressortir plus vivement les contours des bactéries, d'une autre part pour éliminer tous les corps nuisibles à l'image.

La coloration et la décoloration ne sont ordinairement pas nécessaires pour l'étude physiologique de la fermentation, où les organismes sont la plupart du temps libres et rarement mêlés à des éléments gênants, et il n'y a que peu de cas où la coloration fit reconnaître des caractères spécifiques (*Bacterium aceti* et *B. Pasteurianum*).

Par contre, il est souvent nécessaire, dans l'étude des organismes de la fermentation et surtout dans celle des bactéries, d'appliquer un autre mode de préparation. Les *sécrétions* tant de nature organique que de nature inorganique, qui apparaissent dans les liquides, ont souvent une *ressemblance frappante avec les différentes formes de bactéries*, et il est souvent extrêmement difficile ou impossible, même pour l'observateur le plus exercé, de déterminer avec certitude si les petits corps sphériques qui se trouvent dans le champ du microscope, sont des bactéries sphériques ou des sécrétions du liquide. Dans ces cas douteux, il est convenable, avant d'entrer dans l'examen physiologique que nous décrirons plus tard, d'avoir recours aux *réactifs microchimiques*, qui donnent souvent des indications préliminaires très utiles. Dans la bière et en général dans les liquides nourriciers contenant des matières albumineuses, celles-ci se présentent souvent sous forme de sécrétions sphériques ou fibreuses; de même les granules d'amidon, les dextrines formées par l'amidon et enfin quelques parties intégrantes du houblon peuvent affecter la forme de petits corps sphériques. Une légère addition d'alcool, d'éther, de chloroforme, d'acide acétique, de soude, de potasse, etc., pourra donner quelques éclaircissements dans ce cas, les substances résineuses étant par exemple attaquées par les premiers, tandis que les sécrétions albumineuses le sont plus ou moins par les derniers.

L'emploi de l'iode nous fera voir les granules d'amidon comme points bleus, tandis qu'il fera apparaître certaines dextrines en rouge.

Pour les organismes supérieurs de la fermentation, les levures et les moisissures, on se sert des colorations dans un autre but, savoir, pour reconnaître *quelles substances se trouvent dans la membrane ou dans la cavité cellulaire* pendant les différentes phases de la croissance. Si l'on ajoute par exemple du chlorure ferrique ou un autre sel de fer à des cellules qui contiennent du tannin, celles-ci se colorent en bleu noir ou en vert. On constata de cette manière que, pendant la première période de la fermentation, les cellules du *Saccharomyces cerevisiæ* contenaient une quantité considérable de tannin. En traitant des cellules de levure avec une solution d'hématoxyline ou d'acide osmique, on peut reconnaître un petit corps foncé, à contours nettement marqués, qui est un noyau cellulaire de même nature que ceux que l'on observe sur la plupart des plantes, généralement sans préparation préalable.

2. — Études de morphologie et d'évolution à la table du microscope; chambres humides.

Une connaissance vraiment approfondie des organismes de la fermentation ne peut être obtenue que par *l'étude physiologique*. Comme nous l'avons indiqué précédemment, il y a plusieurs années que l'on s'efforça de trouver des méthodes de ce genre. Cependant l'absence totale de critique dans l'exécution des expériences les fit échouer complètement, et il s'opéra une réaction qui fut entre autres formulée dans le travail de Reess sur les *Saccharomyces* (1870) où celui-ci déclare formellement n'avoir pris aucune précaution pour obtenir des cultures pures ; c'est à tel point que ces cultures étaient tombées en défaveur. Pen-

dant les années suivantes, la chose prit une autre tournure, et c'est peut-être un fait unique dans l'histoire des sciences, que, dans un si court espace de temps, une nouvelle méthode de recherches se soit non-seulement frayé un chemin, mais qu'elle ait conduit dans la science pathologique et dans notre branche spéciale à des résultats pratiques qui amenèrent une révolution dans plusieurs notions que l'on croyait établies d'une façon inébranlable.

L'étude physiologique des microorganismes a pour but d'approfondir la connaissance du développement et des phénomènes vitaux de ces êtres. Les moyens à employer consisteront évidemment à fournir aux microorganismes des conditions de développement et de multiplication telles, qu'il soit possible de suivre les transformations progressives de l'organisme et des substances qui en sont influencées. Tant que l'on ne désire obtenir que *la connaissance des diverses formes* que l'organisme en question peut affecter pendant son développement, les conditions sont faciles à produire. Mais lorsqu'on demande une culture en grand d'individus dérivant tous d'une seule cellule de l'espèce, en vue d'obtenir par des *expériences physiologiques, chimiques ou purement pratiques*, sur un plus grand nombre de ces organismes, des éclaircissements sur les relations qui relient leurs formes aux influences extérieures, ainsi que sur toute leur activité vitale, la chose devient beaucoup plus compliquée. Dans le premier cas, on n'exige qu'une culture dans laquelle l'organisme puisse se développer librement, sans s'inquiéter s'il s'y trouvent aussi d'autres individus ou espèces. Dans le dernier cas, *on exige une culture absolument pure.*

Il y a certains cas où les cultures de la première espèce fournissent des données, comme par exemple dans celui dont nous avons déjà parlé plus haut, où l'on a un liquide nourricier dans lequel des sécrétions de diverses espèces ont une ressemblance plus ou moins frappante avec cer-

taines formes de bactéries, de sorte que l'examen microscopique seul ne peut pas nous instruire exactement sur la nature de ces petits corps. Alors on aura à résoudre par l'expérience la question de savoir si ces petits corps *sont susceptibles de se multiplier*.

Une goutte du liquide sera portée dans une chambre humide, par exemple dans celle de Ranvier (Fig. 1). Cet appareil s'obtient en pratiquant une très légère excavation au milieu d'un porte-objet ordinaire en cristal. Tout autour de cette excavation on creuse une rainure plus profonde, destinée à recevoir de l'eau. La goutte du liquide nourricier, qui doit être très petite, est portée dans le milieu du petit renfoncement et recouverte d'un couvre-objet dépassant la rainure, et que l'on colle avec de la vaseline. La goutte se trouve ainsi étendue sous le couvre-objet dans le renfoncement du porte-objet et préservée contre l'évaporation par l'eau stérilisée qui est dans la rainure.

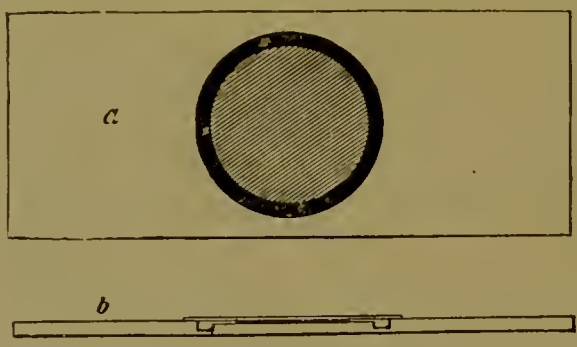

Fig. 1.

Chambre humide de Ranvier,
a Vue d'en haut.
b Vue de côté.

Une autre forme de chambre humide est celle de Böttcher (Fig. 2), que l'on obtient simplement en fixant un anneau en verre sur un porte objet ordinaire. On met quelques gouttes d'eau stérilisée à l'intérieur, et l'on suspend la gouttelette du liquide nourricier contenant les organismes au couvre-objet qui s'applique sur le bord de l'anneau de verre avec de la vaseline.

On place un appareil de ce genre sous le microscope et l'on observe de temps en temps les transformations des corps, ou bien on l'introduit dans un thermostat à température convenable et constante pour l'en sortir à des intervalles déterminés, afin de le soumettre à l'examen microscopique.

Ces appareils sont donc construits pour des observations morphologiques ou botaniques à la table du microscope ; mais dès qu'il s'agit d'exécuter des recherches physiologiques, il faut que les cultures pures soient en même temps développées en culture en masse. Ce sont principalement Pasteur, Lister, Koch et Hansen qui ont développé les méthodes dans ce sens. (Voir p. 27). La préparation de la culture pure).

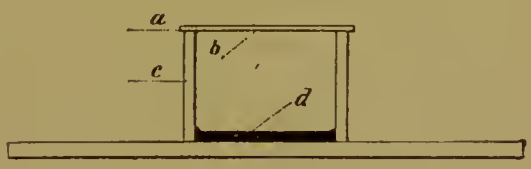

Fig. 2.

Chambre humide de Böttcher.

a Couvre-objet.
b Couche nutritive.
c Anneau de verre.
d Eau stérilisée.

Toute fermentation, soit qu'elle produise de la bière, du vin, de l'alcool, du vinaigre ou toute autre substance, dépend d'une végétation d'organismes vivants de « ferments organisés », et dans la pratique, l'industriel s'efforce d'obtenir une culture aussi pure que possible des formes les plus favorables à sa fabrication. Tout en ayant réalisé à notre époque, avec une connaissance plus approfondie des moyens et du but de ces travaux, de grands progrès, il y aura certainement toujours des limites que, pour des raisons purement pratiques, l'on ne pourra pas dépasser. Ainsi, dans la pratique, les cultures n'atteindront jamais le degré de « pureté absolue ». Mais c'est un des traits les plus saillants dans l'état actuel de l'industrie de la fermentation, que l'on soit arrivé, par l'intelligence exacte de l'importance des organismes qui s'y rapportent en tant

qu'agents essentiels, à travailler en vue d'affranchir, d'une manière toujours plus parfaite, les espèces vraiment actives et utiles de l'influence des formes nuisibles. L'importance capitale de cette dernière condition ne fut reconnue que lorsque Hansen démontra, par le choix méthodique des races de levure, qu'une végétation pure permettait une fabrication plus sûre et plus uniforme que les levures impures et inconnues employées jusqu'alors. Nous reviendrons plus tard sur ce point, au chapitre VI.

Pour les recherches faites au laboratoire, où il s'agit également de cultures des organismes de la fermentation, les exigences sont naturellement plus sévères que pour les expériences exécutées en pratique. Ce qu'on demande ici, c'est de travailler invariablement avec *des cultures absolument pures*, soit sur une petite échelle, soit avec des quantités telles, que les cultures puissent, à un moment donné, quitter le laboratoire pour être introduites dans l'exploitation industrielle. On cherche à réaliser, dans un laboratoire spécialement aménagé pour ce genre d'études, les conditions qui font défaut dans l'application technique. Nous allons les indiquer brièvement ainsi que la manière de les réaliser, en commençant, pour des motifs purement historiques, par le dernier article, c'est-à-dire par l'étude des récipients et des liquides destinés à recevoir la petite culture pure primitive, ainsi que les moyens employés pour l'élevage. Il est nécessaire, avant de recevoir l'ensemencement, que ces récipients et ces liquides soient *stérilisés*, c'est-à-dire rendus vierges de tout germe vivant susceptible de développement, et qu'en outre les autres appareils ainsi que l'air de la salle dans laquelle on travaille, contiennent le moins possible de germes vivants. La même remarque s'applique naturellement aussi aux mains et aux vêtements de l'opérateur.

3. — Stérilisation.

Les principes de toute la technique de la stérilisation ainsi que les types d'appareils nécessaires étaient déjà indiqués dans les anciens travaux sur la génération spontanée (*generatio æquivoca* ou *spontanea*).

En 1765, Spallanzani combattit déjà la doctrine soutenue par Needham et Buffon, à savoir que des êtres vivants pouvaient prendre naissance par génération spontanée dans des liquides ou d'autres substances en décomposition. Spallanzani chauffa de l'extrait de viande dans des ballons bouchés et démontra qu'il ne s'altérait pas jusqu'au moment où l'on donnait accès à l'air. Il en conclut que les germes qui se développaient à partir de ce moment dans les ballons débouchés, devaient provenir de l'air. Plus tard, en 1782, Scheele fit remarquer qu'en chauffant du vinaigre, on pouvait le conserver plus longtemps que sans cette opération. Toutefois, on ne tint aucun compte de sa découverte. En 1810, Appert publia son livre sur la conservation de plusieurs aliments et liquides au moyen de la chaleur. Dans la quatrième édition de son livre, qui parut en 1831, il donna des instructions précises sur la manière de traiter le vin, la bière et d'autres liquides, lesquelles répondent à celle que l'on emploie encore aujourd'hui, c'est-à-dire à la pasteurisation.

La période suivante, si riche en découvertes pour la microbiologie, produisit les travaux de F. Schulze et de Th. Schwann. Ceux-ci prouvèrent que lorsque des liquides facilement altérables ont été soumis à une forte cuisson, ils restent stériles si l'on fait rentrer ensuite l'air par de l'acide sulfurique ou par des tubes rougis à la flamme. A la même époque, Cagniard-Latour et Schwann décrivirent les cellules de la levure de bière et Kützing les ferments acétiques. Turpin érigea, en 1838, la thèse si significative :

« Point de décomposition de sucre, point de fermentation sans l'acte physiologique d'une végétation. »

Enfin, l'objection soulevée contre les expériences de Schulze et de Schwann, à savoir que l'air pénétrant dans les ballons, après avoir subi le traitement de l'acide sulfurique ou du tube rougi à la flamme, n'était plus en état de fournir des conditions suffisantes de croissance aux germes qui se trouvaient dans le liquide, fut définitivement écartée par les belles expériences de Schröder et de Dusch (1854). Ces savants firent passer l'air par des filtres de ouate et arrivèrent au même résultat.

Lorsque les principes pour toute la technique de la stérilisation furent ainsi établis, ces études acquirent un développement considérable et trouvèrent une vaste application tant en science qu'en pratique, grâce à Pasteur en particulier et à d'autres savants éminents qui s'y sont voués plus tard.

1. — Stérilisation d'objets en verre et en métal.

La stérilisation proprement dite doit toujours être précédée d'un nettoyage complet mécanique et quelquefois même chimique. Les objets dont on se sert journellement au laboratoire, tels que les spatules, les aiguilles, les fils de platine, etc., se chauffent directement dans la flamme, après quoi on les laisse refroidir dans un endroit exempt de germes. Il y a cependant beaucoup d'appareils qui ne supportent pas ce traitement ; ceux-ci doivent alors être stérilisés soit par voie humide, en les faisant cuire dans de la vapeur d'eau ou au bain-marie, soit dans l'air sec, au moyen de fours à stérilisation spécialement destinés à cet usage, où ils sont chauffés pendant une ou deux heures à 150° C. Les objets peuvent, selon leur nature, être placés directement dans le four à stérilisation, ou bien doivent être enveloppés dans du papier. Les orifices des ballons

sont munis de tampons de ouate, que l'on recouvre souvent de plusieurs feuilles de papier à filtrer.

2. — *Stérilisation des liquides nourriciers et milieux nourriciers solides.*

Les liquides nourriciers peuvent être stérilisés par filtration ou par chauffage. La *filtration* offre l'avantage de faire subir aux liquides moins de transformations que le chauffage, de sorte qu'ils se prêtent mieux au développement de beaucoup d'espèces de microorganismes. Pour que les filtres remplissent leur but, il faut que leur pores soient donc plus petits que les plus petits microorganismes. On a employé dans ce but du plâtre, de l'asbeste, du charbon et de l'argile cuite, en faisant passer par pression ou par aspiration les liquides à travers d'épaisses couches de ces matières. Le modèle dont on se sert le plus, est le filtre en porcelaine de Chamberland. Il demande cependant à être nettoyé fréquemment à sa surface et à être souvent stérilisé par le chauffage, car on a observé que les bactéries pouvaient finalement croître par les pores (1).

(1) Dans les dernières années, le *filtrage de la bière* s'est beaucoup répandu dans les brasseries; comme matière filtrante, on emploie le papier, la cellulose, l'asbeste, etc. Si parfois on a l'avantage de débarrasser un liquide, d'ailleurs sain, de sécrétions de toute sorte et de le rendre limpide, il est incontestable que par l'emploi irréfléchi de la filtration, *on s'expose à de grands dangers*, ce qui a été directement prouvé par les expériences de Thausing, Wichmann, Reinke et d'autres. Quand les filtres ne sont pas assez efficaces, il arrive facilement qu'ils ne retiennent que les cellules de levure, mais qu'ils laissent passer les bactéries ; ces dernières peuvent alors agir d'autant plus énergiquement sur le liquide Un autre grand danger est que le filtre peut devenir, par suite d'un nettoyage insuffisant, un foyer de germes les plus variés, qui infectent la bière passant au travers. Lorsqu'un seul fondre d'un chantier est infecté, et qu'après la filtration de cette bière le filtre n'est pas vraiment *stérilisé*, on transmettra la maladie à toute la bière filtrée ensuite.

Les liquides et les milieux nourriciers solides sont, dans la plupart des cas, stérilisés par le *chauffage*. La manière dont cela doit se faire et la durée de l'action des températures élevées dépendent de la nature du milieu qui est à stériliser. On peut employer l'ébullition directe dans le bain de sable, comme par exemple pour la stérilisation du moût de bière dans le ballon de Pasteur, ou bien le bain-marie. Un moyen de stérilisation excellent pour cet usage est la vapeur d'eau, soit à l'état de courant sans pression, soit sous pression (110-120° C.), en employant *la marmite de Papin* (*autoclave*). Pour le refroidissement, il faut prendre les précautions nécessaires, afin qu'il n'y ait que de l'air absolument pur qui rentre dans le récipient sur la substance stérilisée. Cela s'obtient en filtrant l'air rentrant à travers de la ouate ou à travers de tubes plusieurs fois recourbés, si l'aspiration se fait lentement et avec peu de force (1).

Les gélatines nourricières en particulier demandent à être traitées avec beaucoup de prudence, car elles perdent facilement, sous l'influence d'une chaleur trop forte ou trop prolongée, leur faculté de gélatinisation.

Si la substance à stériliser ne supporte pas la tempéra-

(1) Par l'opération dite de la *pasteurisation de la bière*, on ne veut ordinairement atteindre qu'une stérilisation relative, c'est-à-dire que l'on cherche, en traitant avec précaution la bière à de hautes températures, à entraver les cellules de levure de manière à ce que leur pouvoir reproductif et leur action fermentescible soient réduits à très peu de chose. Ce n'est que pour les transports lointains que l'on cherche à tuer dans la bière tous les germes vivants. On ne peut donner de règles générales pour un traitement de ce genre. La méthode exacte dépend autant de la composition du liquide que des qualités de la levure, et il faut par conséquent toujours faire des expériences préalables, non-seulement sur la hauteur de la température à appliquer, mais aussi sur le temps qui est nécessaire pour qu'elle produise son action.

LES

MICROORGANISMES

DE LA

FERMENTATION

PAR

ALFRED JOERGENSEN

Directeur du Laboratoire pour la Physiologie des Fermentations et la Technologie des Fermentations, Copenhague

Traduit par

M. PAUL FREUND

ET REVISÉ PAR L'AUTEUR

Avec 56 illustrations dans le texte

PARIS

SOCIÉTÉ D'ÉDITIONS SCIENTIFIQUES

PLACE DE L'ÉCOLE DE MÉDECINE

4, RUE ANTOINE-DUBOIS, 4

—

1895

Tous droits réservés.

ture d'ébullition sans se décomposer ou perdre complètement sa nature primitive, il faudra recourir à la *stérilisation fractionnée*.

C'est par exemple le cas pour le sérum de sang employé dans l'étude des bactéries à l'état gélatineux. Chauffé à 100° C., il devient liquide en perdant la propriété de se coaguler, et l'on est donc obligé de procéder d'une autre manière pour l'obtenir stérilisé et à l'état gélatineux. On remarqua qu'une température de 58 à 62° C. suffisait déjà pour tuer les bactéries végétatives qui se développent dans le sérum du sang. Après ce traitement, il n'y a que les spores des bactéries qui restent en vie. En plaçant le sérum gélatinisé pendant quelques jours dans le thermostat à une température de 30 à 40° C. favorable au développement des spores, la plus grande partie de celles-ci germera, et l'on pourra alors tuer les nouveaux fils végétatifs par un second chauffage à 60° C. En répétant plusieurs fois cette opération, la masse gélatineuse restera stérile pendant un temps illimité, à condition que les germes suspendus dans l'air n'y aient pas accès. Ce procédé, également employé pour la stérilisation du lait, a été inventé par Tyndall, et son emploi a été motivé d'une manière plus précise par Koch.

Un procédé analogue s'emploie dans les laboratoires destinés à l'étude de la physiologie de la fermentation, pour le traitement des liquides nourriciers qui, par l'ébullition, déposeraient une quantité considérable d'albuminoïdes et qui deviendraient par cela des liquides nourriciers assez médiocres pour la levure alcoolique [1].

(1) Dans la pratique, on cherche aussi à obtenir une stérilisation avec l'aide *d'appareils clos pour le refroidissement et l'aération du moût, que l'on veut amener dans les cuves de fermentation*. Il est vrai qu'il est impossible que le moût se conserve dépourvu de tout germe étranger à la fermentation dans des cuves découvertes ; mais, *en comprenant bien la*

3. — *Stérilisation de l'air.*

La stérilisation de l'air se fait le plus aisément, comme cela a déjà été indiqué, au moyen de filtres de coton; les bains d'acide sulfurique, d'eau salée, les filtres de toile etc., sont moins efficaces. Dans les laboratoires où il s'agit souvent d'exécuter des travaux dans de l'air privé de tout germe, on se sert d'une caisse en verre dont une paroi peut être soulevée suffisamment pour permettre d'y introduire les bras. Avant de se servir de cette caisse, on en lave tout l'intérieur et on la ferme. Les particules et les germes qui voltigent dans l'air tomberont dans le fond humide où ils resteront retenus.

4. — Désinfection.

Une autre méthode pour tuer les germes gênants consiste à employer des *désinfectants* qui agissent comme toxiques sur les organismes. Grand nombre de ces substances trouvèrent leur application dans la pratique. La limite pour l'emploi de pareilles substances toxiques doit être déterminée dans chaque cas particulier. La manipulation de ces poisons pouvant être préjudiciable à celui qui opère, il s'agit de déterminer jusqu'à quel degré il est permis *de les diluer*, pour qu'ils agissent encore efficacement.

chose, on peut y contribuer pour beaucoup. Le praticien intelligent aura toujours soin que l'air de la cave de fermentation soit aussi pur que possible, que les cuves soient propres, de même que tous les appareils que l'on plonge dans le liquide en fermentation — tels que thermomètres, petits verres, etc., — *enfin que tout soit d'une propreté irréprochable. Il va sans dire que toutes ces mesures de précaution n'ont obtenu une valeur réelle dans l'application qu'après que, par la réforme de Hansen, la levure garantie pure eut été introduite dans la cave de fermentation.*

Des recherches sur la résistance des diverses espèces de microorganismes contre les toxiques ont démontré que la force de résistance des cultures d'une seule et même espèce peut être très différente, non-seulement pour les spores, mais aussi pour les formes végétatives. La nouvelle et l'ancienne culture se comportent différemment et c'est aussi le cas pour les individus d'une même culture. En outre, il est une règle pour les expériences de ce genre, que les organismes qui ont été traités par un désinfectant doivent ensuite être placés dans les meilleures conditions de vie possibles, sans quoi ils n'arrivent pas à se développer, même s'ils sont vivants et capables de se reproduire. En général, on ne devra pas se contenter de la température ordinaire ambiante et du milieu nourricier solide. Il faut aussi consacrer un certain temps à l'examen de telles végétations avant d'affirmer définitivement qu'elles soient tuées, car elles ne sont souvent qu'arrêtées et reprennent vie après quelque temps, pour se développer avec toute la vigueur. Lorsqu'on emploie un désinfectant, il y a encore la matière dans laquelle se trouvent les organismes, ainsi que la température, qui peuvent avoir de l'importance. Avant d'examiner une culture traitée de la sorte, il faut avoir excessivement soin de la débarrasser, par lavage et par dilution, des dernières traces du désinfectant.

En 1839 Schwann fit déjà observer que les cellules de levure étaient tuées par certains produits chimiques, et qu'en même temps la fermentation s'arrêtait. Ainsi fut posée la base de la théorie des antiseptiques.

C'est à Koch que nous devons les premières communications détaillées sur ce sujet. Plus tard, Gruber, entre autres, continua ces expériences.

Koch étudia différents toxiques tant au point de vue de la concentration nécessaire pour tuer les bactéries et leurs spores, qu'à celui de la quantité nécessaire pour ne faire

qu'enrayer le développement des microorganismes dans les liquides nourriciers convenables.

Nous donnons ici brièvement les résultats des expériences en question de Koch : l'acide phénique ne fit pas preuve d'un pouvoir désinfectant aussi grand que l'on croyait. Une solution à 5 0/0 ne détruisit qu'au bout de 48 heures la faculté de se développer chez les spores de l'anthrax, tandis que les bacilles eux-mêmes furent tués en deux minutes par l'action d'une solution à 1 0/0. Pour enrayer la croissance de ces derniers, une solution de 1/850 suffit, une humectation des spores du bacille de l'anthrax répétée 5 à 7 fois avec une solution au 5 0/0 fut capable d'en retarder le développement. En solution huileuse ou alcoolique au 5 0/0, l'acide phénique fut absolument sans effet sur les cellules et les spores de l'anthrax. Sous forme de vapeurs, l'acide phénique agit plus énergiquement ; cependant les vapeurs d'acide phénique à 75° C. ne purent pas détruire, dans l'espace de deux heures, la faculté de développement des spores mentionnées. L'acide sulfureux, même dans les conditions les plus favorables, n'est pas capable de détruire tous les germes. Par contre, le chlore, le brome et le sublimé corrosif sont des désinfectants très sûrs. Le sublimé corrosif a, d'après Koch, dans la proportion de 1/1000 une action destructive sur tous les germes. Toutefois, d'après les expériences de Johan-Olsen les moisissures ne sont détruites que par des solutions plus concentrées, par exemple au 1/400 pour le *Penicillium glaucum*. Il y a aussi plusieurs bactéries (les bacilles de la fièvre puerpérale, des abcès, de la putréfaction) qui germent et croissent, quoique d'une façon plus lente que normalement, sur des tranches de pommes de terre imprégnées d'une solution de sublimé au 1/500, et ce n'est qu'une solution au 1/300 qui en arrête le développement. Gruber trouva, par ses expériences les plus récentes, exécutées avec toutes les précautions imagina-

bles, que par exemple les spores de l'anthrax n'étaient tuées rapidement que par du sublimé au 5/1000, par du sublimé-chlorhydrique au 1/1000, par du sublimé-tartrique au 1/1000.

Pour le nettoyage des tuyaux, des bacs, etc., où se trouvent souvent des dépôts considérables de matières organiques qui se décomposent facilement par l'action des microorganismes, *les solutions de soude* sont particulièrement recommandables : elles ont une action dissolvante et désagrégeante sur les résines et sur les matières albumineuses, qui peuvent alors être facilement enlevées par de l'eau. D'après les expériences d'Aubry et de Will, le *chlorure de chaux,* même fortement dilué (2 à 5 0/0 de chlore), a été reconnu comme un excellent désinfectant à cause de son action destructive sur les microorganismes. Le prix modique de cette substance permet surtout de l'employer pour le nettoyage des murs, des pavés, des égouts, etc. Le *bisulfite de chaux*, employé en solutions, contenant de 2 à 4 0/0 d'acide sulfureux, agit aussi très énergiquement. Les *sacs à trouble*, employés dans les brasseries, et dont le tissu contient souvent, d'après les recherches de M. Will, *de forts dépôts de levures sauvages et de bactéries* par suite d'un mauvais nettoyage, doivent être désinfectés par une solution de chlorure de chaux. M. Will recommande, basé sur ses expériences pratiques, une solution contenant 1 0/0 de chlore actif, qui correspond à peu près à 3-3 1/2 kilos de bon chlorure de chaux du commerce, sur 1 hectolitre d'eau. Ensuite on les lave à l'eau pure. Dans les laboratoires physiologiques, où il s'agit tout particulièrement de se garantir contre l'invasion des germes étrangers, une solution alcoolique d'acide salicylique sera d'un emploi efficace. (Dans le laboratoire de Carlsberg, Hansen l'emploie souvent pour le nettoyage des tables). Les propriétés enrayantes de l'acide salicylique sur la fermentation sont généralement

connues [1]. Dans ces derniers temps, on a aussi employé l'acide fluorhydrique comme substance désinfectante (voir page 32).

5. — Ballons, Flacons et Récipients.

(Systèmes Pasteur, Chamberland, Freudenreich, Hansen et de Carlsberg.

La première condition exigée des vases servant à l'élevage des cultures, est qu'ils soient construits de manière à ce que toute infection du dehors soit rendue impossible. *Les ballons Pasteur* remplissent toutes les

(1) On a fait, depuis plusieurs années, dans les distilleries et les fabriques de levures sèches, des séries d'expériences sur l'influence que peuvent avoir certains antiseptiques sur les cellules de levures, leur force fermentative, la quantité d'alcool provenant de la fermentation et enfin sur la reproduction des cellules.

Hayduck a trouvé en 1881, que de très petites doses d'acides (acide sulfurique, acide lactique) favorisent non-seulement la fermentation, mais encore le développement des cellules.

En 1882, Heinzelman découvrit que l'acide salicylique augmente la force fermentative en ce sens que, sous l'influence de cet acide, la levure produit dans le même temps, une quantité d'alcool plus grande que celle résultant de la fermentation de la même levure sans l'action du même acide.

Plus tard, Biernaki, en 1887, et Schulze, en 1888, ont démontré que tous les antiseptiques, dans des conditions particulières, et surtout employés en faibles doses, possèdent la propriété d'accélérer la fermentation et de l'augmenter.

Les recherches d'Effront faites dans le même but, montrent qu'il est possible, par l'emploi de petites quantités d'acide fluorhydrique, de stimuler les cellules de levures.

Enfin, les expériences de Hirschfeld s'enchaînent avec les précédentes. De ses observations, il résulte qu'une addition de 0.01 à 0.02 0/0 d'acide chlorhydrique peut accélérer la fermentation acétique.

conditions exigées d'une façon irréprochable [1]. La figure 3 montre un de ces petits ballons dont la forme, légèrement modifiée, est celle qui est employée dans le laboratoire physiologique de Carlsberg, dirigé par Hansen. Les vapeurs sortent pendant l'ébullition, par la tubulure droite, plus large, à laquelle est adapté un tube en caoutchouc; quand ce dernier est fermé, les vapeurs n'ont d'autre issue que par le tube recourbé. Au bout de quelque temps, on retire le ballon du bain de sable, et l'on bouche le tube recourbé avec un bouchon d'amiante. Alors la stérilisation est complète et le contenu du ballon pourra rester intact pendant des années. Pendant le refroidissement ou pendant l'aspiration qui s'ensuit, l'air est filtré en partie par le bouchon d'amiante; les germes qui pourraient être entraînés se déposent à la partie inférieure du coude ou atteignent tout au plus l'élargissement du tube étroit, de sorte qu'ils n'entrent pas en contact avec le liquide. Ceci nous indique ce que l'on doit faire si l'on est obligé d'agiter fortement le liquide dans le ballon ou de le faire sortir par le tube droit, tout en voulant le préserver de toute infection: la partie inférieure du tube doit être

Fig. 3.
Ballon Pasteur.

(1) Chevreul et Hoffmann avaient, il est vrai, déjà trouvé que si l'on se servait pour la stérilisation des liquides, de vases munis de tubes ouverts mais recourbés, les liquides se conservaient toujours stériles. Quoique ce soit Chevreul qui, le premier, donna l'idée de ces ballons, pour des raisons pratiques nous n'en changerons pas le nom ; c'est d'ailleurs bien à Pasteur que l'on en doit l'emploi fréquent qui en est fait partout aujourd'hui.

chauffée à la flamme. Si le ballon doit être débouché pour être mis en communication avec un autre, il faudra soit opérer dans un petit espace exempt de germes, soit procéder au débouchage et à la mise en communication dans une flamme. On place un bec Bunsen devant soi, le ballon que l'on veut vider à sa gauche, et celui destiné à recevoir le liquide ou la culture à sa droite. Cela fait, on ouvre le tube du ballon de gauche dans la flamme, en y retirant rapidement le serpentin avec son bouchon de verre. Pendant que le tube ouvert se trouve dans la flamme, on retire vite le bouchon de verre du ballon de droite, et le tube chauffé du premier ballon est adapté à la tubulure du second. Puis on fait passer le liquide dans le second ballon en chauffant le tube recourbé du premier. Après, on introduit de nouveau le tube latéral du ballon de gauche dans la flamme, en remettant en même temps le bouchon de verre flambé du ballon de droite à sa place, et enfin l'on scelle *à la flamme* le ballon de gauche avec sa tubulure et le bouchon de verre qui s'y trouve. En opérant rapidement, il n'y aura guère de danger d'infection.

Fig. 4.
Flacon Chamberland.

Le ballon Pasteur sera, dans certains cas, indispensable, par exemple pour les études physiologiques, où l'on travaille avec des quantités de liquide plus considérables.

Dans les dernières années, on fit usage d'autres ballons et vases, principalement des flacons Chamberland (Fig. 4). dont le col est muni d'un bouchon rodé à l'émeri et se terminant à la partie supérieure par un tube court et ouvert, rempli de coton stérilisé bien tassé.

Le flacon de Freudenreich est construit d'après le même principe, sauf que le corps en est cylindrique.

Dans des cas spéciaux, on emploie le flacon de Hansen (Fig. 5). Le bouchon rodé à l'émeri et en forme de capuchon, est muni d'un filtre de ouate (a), et il se trouve au flacon un petit tube latéral bouché avec un tampon d'amiante (d). On emploie ce flacon pour la conservation des cultures pures, ainsi que pour l'expédition de petites cultures ou d'échantillons pris dans l'appreil propagateur [1]. Dans le premier but, on remplit le flacon à moitié d'une solution de saccharose à 10 0/0, dans laquelle on sème une par-

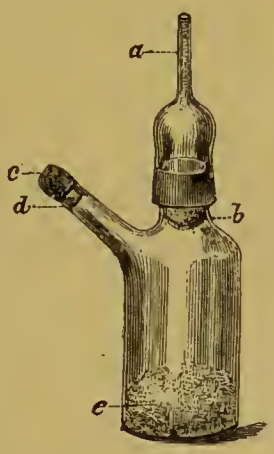

Fig. 5.

Flacon de Hansen.

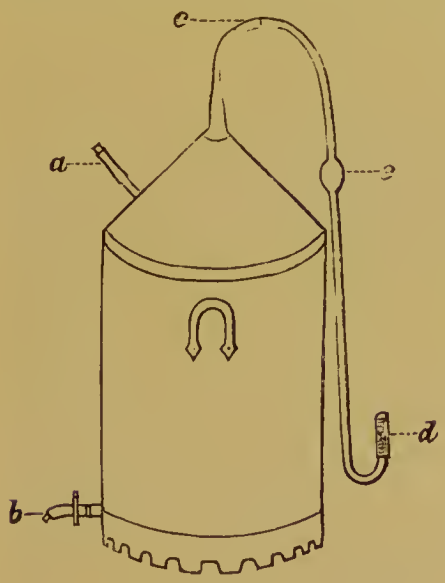

Fig. 6.

Récipient de Carlsberg.

celle de la levure en question. Le tampon d'amiante et le bord inférieur du bouchon se recouvrent d'un enduit de cire à cacheter (c). Pour les autres usages nommés en dernier lieu, on remplit le fond du flacon d'une couche de coton (e) et l'on en place aussi un tampon à l'intérieur du bouchon, au-dessous du filtre. Pour le mode d'emploi, voir le chapitre VI.

Pour l'élevage de très grandes cultures, on se sert des

(1) Ces appareils seront décrits au chapitre VI.

récipients de Carlsberg (Fig. 6). Ils contiennent 10 litres, sont en cuivre étamé, cylindriques et coniques par le haut. Au sommet du cône est vissé ou soudé un tube deux fois recourbé (c.d.) muni d'un renflement (e). Sur une arête du cône se trouve le tube d'infection avec son bouchon de verre (a) et au bas du cylindre le tube (b) pour l'extraction du liquide fermenté et de la levure. Ce tube est muni d'une pince à vis. Après la stérilisation du liquide, on bouche le tube recourbé avec un filtre d'amiante ou de ouate (d) qui est adapté solidement ou bien fixé par un raccord. On trouvera des détails plus amples sur l'emploi de ces récipients dans l'ouvrage de Hansen, *Untersuchungen aus der Praxis der Gährungsindustrie* » (chez Oldenbourg, Munich. 1890-92).

6. — Milieux nourriciers.

En ce qui concerne les *milieux nourriciers,* il s'agit naturellement toujours de trouver ceux qui conviennent le mieux aux organismes que l'on veut cultiver. Si en même temps, ils possèdent l'avantage d'être par eux-mêmes peu favorables au développement des espèces concurrentes, on aura beaucoup gagné. Dans la règle, si l'on fait des expériences comparatives, le liquide nourricier devra toujours rester le même. Pour l'étude des ferments alcooliques, Hansen emploie le plus souvent le moût houblonné des sacs à trouble; dans des cas spéciaux, de l'eau de levure, additionnée de glucose ou d'une solution aqueuse de saccharose ou d'autres solutions sucrées, s'emploie pour les recherches de ce genre. Si l'on veut employer un milieu nourricier solide, on peut mêler au liquide 5 à 10 pour cent de gélatine. Pour les études bactériologiques, on emploie des liquides analogues ou plus souvent encore de l'extrait de viande additionné de peptone; on neutralise ce mélange par exemple avec du bicarbonate de soude.

Comme moyens de solidification, on emploie soit de la gélatine, soit de l'agar-agar. Pour l'étude des moisissures, les milieux nourriciers solides sont les meilleurs ; dans la plupart des cas on emploiera de préférence le pain noir stérilisé. Si l'on veut employer des liquides, ceux qui conviendront le mieux seront le moût de bière, des décoctions de fruits ou des solutions sucrées additionnées d'acide tartrique ou de tartrates. Pasteur employa exclusivement des liquides comme milieux nutritifs dans les recherches qu'il fit sur les organismes de la fermentation. Plus tard, les milieux solides furent beaucoup employés, et sous ce rapport Koch nous a principalement donné de nombreux avis pratiques.

Nous venons d'exposer brièvement comment nos microorganismes se cultivent et comment on les protège contre les infections provenant soit du liquide lui-même, soit des récipients et ustensiles, de l'air ou de l'expérimentateur. La première et en même temps la plus importante question qui se pose maintenant, est celle-ci : *comment obtient-on la première culture absolument pure qui doit être introduite dans le ballon?* Pour des motifs purement *historiques*, j'ai indiqué en premier lieu *les conditions pour la conservation de la culture pure*, car on les connaissait longtemps avant d'être arrivé à préparer sûrement la culture pure elle-même.

Il sera très instructif de voir comment on a, petit à petit, fait des progrès, et nous traiterons de nouveau le sujet au point de vue historique, à partir du moment où des efforts vraiment rationnels ont été faits pour atteindre ce but.

7. — Préparation de la culture pure.

Une culture véritablement pure ne peut être obtenue *avec certitude* que par *l'ensemencement d'une seule cellule.* Une telle culture est la condition indispensable pour des

recherches exactes sur les microorganismes. Comme cela a été signalé plus haut, ces recherches peuvent avoir des buts différents : celui de suivre *l'individu, la cellule isolée dans les phases de son développement*, c'est l'étude *morphologique* ou bien celui d'étudier *les conditions vitales des régétations qui sont nées de la cellule isolée*, c'est l'étude *biologique* et *physiologique*). De même que ces deux méthodes d'analyses sont très distinctes, de même les manières de procéder devront être complètement différentes.

a. — *Cultures pures pour les études du développement et pour les recherches morphologiques.*

De même que l'on trouva antérieurement, par l'examen de la levure au microscope, que celle-ci se composait de cellules, de même aussi l'on chercha bientôt, par l'examen d'une seule de ces cellules, à déterminer comment elle se multipliait et sous quelles formes apparaissaient les nouvelles générations. On faisait donc un examen morphologique d'une culture pure. Il fallait alors s'arranger de manière à ce que l'observation ne fut pas dérangée par d'autres cellules, pouvant entraver la cellule choisie dans sa reproduction, ou la cacher aux yeux de l'observateur. Il ne fut d'ailleurs attaché aucune importance à des cellules étrangères qui auraient pu se présenter dans d'autres parties de la préparation, ou en général dans toute la préparation.

Ehrenberg a déjà observé en 1821, par des investigations de ce genre, la germination de quelques spores de champignons. Plus tard Mitscherlich, Kützing (1851) et F. Schulze (1860) ont observé de la même manière la multiplication des cellules de levure. On diluait une petite quantité de levure haute avec du moût de bière jusqu'à ce qu'elle ne contienne plus qu'une ou deux

cellules de levure : avec une de ces gouttes, on faisait une préparation ordinaire que l'on scellait et que l'on regardait directement au microscope pour étudier le développement de la cellule. Plus tard Tulasne (1861) et surtout de Bary (1866), employèrent principalement le même procédé dans leurs célèbres recherches sur la germination des spores des champignons. Brefeld alla plus loin dans ses recherches et suivit le développement du mycélium formé par la spore jusqu'à ce que celui-ci eut de nouveau produit des spores. Il semait les spores sur le porte-objet. Si la durée de l'examen devait dépasser le temps qui suffisait à l'évaporation d'une goutte de liquide de dimension ordinaire, il ajoutait de la gélatine au liquide ; au-dessus de l'appareil, on plaçait un petit écran en papier que l'on fixait au microscope pour tenir à l'écart, autant que possible, les germes étrangers. Quand le développement se faisait dans des gouttes ordinaires de liquide, on plaçait la préparation pendant l'intervalle entre les observations, sous une cloche humide de verre. Il ne fut donc pas procédé à un examen ininterrompu, ce qui n'eut pas même été possible pour les champignons de plus grande espèce. D'après toute la disposition de l'expérience, il ne peut donc être ici question de cultures absolument pures ; mais comme cela a été dit plus haut, cette recherche pourra bien être exécutée avec de la matière impure.

b. — *Cultures pures pour expériences physiologiques sur des cultures en masse.*

Si, par contre, le but de la culture pure est de servir à des études *biologiques* ou *physiologiques*, de telle sorte qu'une *culture en masse* de la végétation soit nécessaire, un examen direct sur la table du microscope sera impossible et les procédés décrits plus haut ne pourront par

conséquent pas être employés. Les méthodes que l'on applique dans ce but peuvent être résumées en deux groupes, savoir : les *méthodes physiologiques* et les *méthodes de dilution*. Pour les premières, on emploie des liquides, pour les secondes comme matières diluantes, des liquides ou des gélatines.

a. — Méthodes physiologiques.

Les méthodes physiologiques qui furent employées par Pasteur, Cohn et d'autres, émanant de l'idée que les espèces se trouvant dans un mélange, se multiplieront inégalement, en raison de leurs natures différentes, si toutes sont cultivées dans le même liquide nourricier, sous l'action de températures égales, et cela de telle façon que les espèces qui trouvent des conditions de nutrition défavorables seront peu à peu éliminées par l'espèce ou les espèces qui se trouvent dans des conditions de nutrition particulièrement favorables. Pendant la durée de ces recherches, on a employé des liquides très différents pour ces cultures, par exemple des liquides alcalins pour les végétations de bactéries; des liquides nourriciers acides pour enlever aux végétations de levure leurs bactéries (de l'acide lactique, de l'acide tartrique, de l'acide fluorhydrique, etc.) Le point faible de toutes les méthodes de ce genre est *que l'on est toujours obligé de prendre comme point de départ des éléments inconnus*, c'est-à-dire *le mélange impur*. Il est donc impossible de savoir quels résultats un tel traitement aménera ; car il est dans la nature des choses que l'on agira toujours au hasard, et à vrai dire, il ne peut donc être ici question d'aucune méthode. Il subsiste toujours la possibilité que les espèces faibles ne soient qu'entravées et réprimées, et non détruites ; lorsque les espèces plus vigoureuses, après avoir atteint le point

culminant de leur développement, entrent dans un état de faiblesse, il y aura, par conséquent, chance pour que d'autres espèces commencent à se multiplier. Il y aura de plus encore toujours la possibilité, que non-seulement une, mais deux ou plusieurs espèces croissent avec la même facilité dans le liquide nourricier, et qu'elles se développent par conséquent avec une vigueur égale. Si l'on étudie par exemple de la levure de bière ordinaire, on pourra très souvent, à l'aide de la méthode de Hansen, éliminer de la même masse de levure plusieurs espèces différentes et typiques de levure dite de culture. Un exemple frappant qui fait voir les dangers que le traitement physiologique peut introduire nous est fourni par le procédé que Pasteur indiqua pour la purification d'une levure de brasserie. La levure impure est introduite dans une solution de sucre de canne à laquelle on a ajouté une petite quantité d'acide tartrique. Le but que l'on se propose dans ce cas, est de délivrer la masse de levure des germes de maladie qui s'y trouvent mêlés, Les recherches entreprises par Hansen ont démontré que, si de cette manière on arrive ordinairement à arrêter ou à réprimer les bactéries qui se trouvent dans la masse de levure, les espèces de levure appelées levures sauvages, parmi lesquelles se trouvent aussi les levures de maladie, se *développeront avec toute vigueur, et réprimeront même dans bien des cas complètement la levure de culture,* c'est-à-dire la levure même que l'on désirait purifier. Les espèces des levures sauvages, les levures de maladie, n'existeraient-elles même au début qu'en quantité minime, pourront arriver, par le traitement Pasteur, à constituer la partie prédominante de la masse entière. Le traitement d'éléments inconnus, choisis sans méthode, a par conséquent mené au résultat opposé à celui que l'on se proposait d'atteindre. Même quand la masse de levure dont il s'agit ne se compose que de va-

riétés de levures sauvages, il est impossible, par le procédé indiqué de Pasteur, de préparer avec certitude une culture pure d'une espèce déterminée du mélange [1].

Si maintenant nous demandons si l'on doit, en général, conseiller l'emploi d'un des procédés mentionnés pour purifier une levure inconnue et impure, la réponse sera, pour les raisons que nous venons d'indiquer, négative. Ceci est exact, peu importe que la culture serve à des usages scientifiques ou industriels, car dans les cultures ultérieures, *le danger ne sera jamais écarté de voir des espèces, toutes différentes de celle que l'on voulait obtenir, prendre le dessus.* Si le point de départ est incertain, le résultat le sera tout autant, et des méthodes de ce genre doivent être considérées aujourd'hui comme surannées et complètement manquées. Elles ont, dans quelques circonstances, une certaine importance en tant qu'elles peuvent servir à préparer le développement d'une vraie culture pure. Dans les différentes branches de l'industrie de la fermentation, il n'y aura *qu'un seul chemin* qui mène au but, c'est celui d'employer les principes suivis depuis des années déjà dans l'agriculture et l'horticulture, et qui consiste à choisir, après des essais con-

(1) D'après le procédé de M. Effront on emploie, dans les distilleries, *l'acide fluorhydrique* comme antiseptique. Un emploi de cette substance pour la purification d'un levain impur — levure de brasserie ou de distillerie — comme le propose Effront, entraîne avec lui les mêmes dangers que l'emploi de l'acide tartrique mentionné plus haut. Des expériences méthodiques faites au laboratoire, de l'auteur ont démontré que, par le traitement d'un levain impur, d'après la formule d'Effront, *le développement des levures sauvages et des mycodermes peut être plus considérable que celui des levures de culture :* on peut voir du même coup, qu'une espèce aussi dangereuse que le *Bacterium aceti résiste dans beaucoup de cas,* à l'action du *traitement;* elle se multiplie même souvent *plus énergiquement* que dans les conditions normales, lorsqu'on emploie l'acide fluorhydrique ou l'un de ses sels.

formes à un plan méthodique, la race particulière qui offre, dans les conditions données, les meilleurs résultats, pour ne se servir que de celle-ci pour l'ensemencement. Mais ceci n'est possible qu'en suivant la méthode de Hansen, sur laquelle nous donnerons des détails plus tard.

b. — Méthodes de dilution.

Les autres méthodes employées dans les études physiologiques sont les *méthodes de dilution* ou ce qu'on appelle les *cultures fractionnées*, et qui sont basées sur le principe qui consiste à diluer les éléments donnés, de telle façon que l'on arrive à la fin à n'avoir plus qu'une seule cellule. Dans la plupart de ces cultures, on ne calcule qu'avec des probabilités. Pour les ferments alcooliques, Hansen a, par contre, transformé ce procédé en une *méthode exacte*.

Lister (1878) est le premier qui a employé des méthodes de ce genre. Pour développer des cultures pures de bactéries d'acide lactique, il détermina, au moyen du microscope, le nombre de bactéries prises dans une très petite goutte de lait caillé, en les comptant dans plusieurs champs de la préparation, pour calculer ensuite leur nombre dans toute la préparation. Ensuite il calculait la quantité d'eau stérilisée nécessaire pour étendre la goutte, afin de pouvoir compter en moyenne moins d'une bactérie par gouttelette. Moyennant cinq de ces gouttelettes, il infecta cinq flacons contenant du lait bouilli. Le résultat fut, que le lait se cailla dans un de ceux-ci qui contenait le *Bactérium lactis*, tandis que les quatre autres flacons restèrent intacts et ne montrèrent aucune trace de bactéries, Nageli et Fitz ont, plus tard, employé le même procédé.

Pour des dilutions de ce genre, on a aussi employé l'air

(Pasteur): une petite portion de levure est desséchée et réduite en fine poussière avec du plâtre. On laisse tomber d'une assez grande hauteur un nuage de cette poussière et, pendant la chute des particules, on ouvre plusieurs ballons dans lesquels on avait préalablement fait le vide (page 45). Il pourra, de la sorte, arriver que des cellules de levure, disséminées dans le nuage, pénètrent isolément dans quelques-uns de ces ballons.

Comparée aux méthodes physiologiques, celle par dilution qui vient d'être décrite, marque un progrès visible; on s'est approché, à cet égard, sensiblement du but. Mais il est évident que, même si la dilution était assez forte, comme dans l'exemple précédent, où de plusieurs ballons un seul montra un développement, il n'est nullement prouvé que ce ballon isolé n'ait reçu *qu'un seul* germe. L'incertitude est donc encore très grande, même dans le cas où l'on peut procéder au dénombrement des individus avec lesquels on opère. Il sera, de plus, en ce qui concerne les bactéries, très difficile et souvent même complètement impossible de les compter. L'exactitude de ces calculs reste en tous cas très problématique. La question qui se pose sera donc toujours celle-ci: comment distinguera-t-on les ballons qui n'ont reçu *qu'une seule* cellule, de ceux qui, malgré les prévisions du calcul, ont été infectés de *plusieurs* cellules? En ce qui concerne les bactéries on n'a, jusqu'à ce jour, trouvé aucun moyen d'y répondre.

Pour la levure, la question fut résolue par Hansen, qui perfectionna le procédé de telle manière qu'il le transforma en une *méthode exacte* (1881). Il se servit d'une dilution avec de *l'eau*, de la manière suivante : on dilue la levure développée dans le ballon, dans une proportion quelconque avec de l'eau stérilisée, et on compte le nombre de cellules contenues dans une gouttelette du liquide que l'on a vivement secoué. Dans ce cas, la déter-

mination du nombre se fait en portant la goutte sur un couvre-objet, au milieu duquel sont gravés quelques petits carrés pouvant servir de points de repère à l'œil ; le couvre-objet se pose sur la chambre humide (Fig. 2). La goutte ne doit pas dépasser la limite des carrés. Cela fait, on procède au dénombrement des cellules contenues dans la goutte. Supposons par exemple qu'elle contienne 10 cellules; on porte alors une goutte d'égale grosseur du liquide, que l'on vient de nouveau de secouer fortement, dans un ballon contenant un volume déterminé, par exemple 20 cm^3 d'eau stérilisée. Il y aura alors une certaine probabilité pour que ce petit ballon contienne à peu près 10 cellules. Si, après avoir secoué fortement et pendant longtemps le contenu, l'on en introduit maintenant 1 cm^3 dans chacun des ballons d'une série de 20 renfermant le liquide nourricier, il sera probable que la moitié de ces 20 ballons auront reçu chacun *une* cellule. Mais le tout ne repose jusqu'à présent, comme dans le procédé de Lister, que sur une probabilité. Si on laisse les ballons en repos pour que le développement continue, on pourra espérer d'obtenir une culture pure dans quelques-uns d'entre eux. Cependant, on ne peut se baser sûrement sur cela et continuer ainsi les recherches. Mais Hansen réussit à ajouter un point qui, seul, donne de la certitude à cette expérience. Si l'on secoue très fortement les ballons infectés pour les laisser ensuite reposer tranquillement, les cellules isolées descendront au fond et resteront collées aux parois du ballon.

Il est évident que si le ballon contient par exemple trois cellules, celles-ci seront, après que le liquide aura été secoué, toujours ou du moins dans la plupart des cas, éloignées l'une de l'autre, de sorte que chacune se déposera isolément au fond. Au bout de quelques jours, on remarquera, en soulevant le ballon avec précaution, qu'une ou plusieurs *taches blanches* se seront formées

au fond du ballon. S'il ne se trouve qu'une seul tache, on aura obtenu la culture pure.

Il est évident qu'au moyen de ce procédé, on est à même d'introduire directement une cellule unique dans le ballon contenant le liquide nourricier.

C'est ainsi que Hansen prépara toutes les premières cultures pures avec lesquelles il fit ses expériences fondamentales sur les ferments alcooliques.

Pour préparer les cultures employées dans les études physiologiques, on a aussi utilisé des *substances nutritives solides*. L'idée de cette méthode a été donnée par Schroeter (1872) qui, dans ses recherches sur les bactéries à pigment, employa entre autres des *tranches de pommes de terre* comme milieu nourricier. Il avait observé, que lorsque de ces tranches avaient été exposées à l'air pendant quelque temps, il se produisait à leur surface des taches et des gouttes de différentes formes et couleurs. Chacune de ces taches contenait le plus souvent *une* espèce déterminée de microorganismes.

Koch a essentiellement développé et perfectionné cette méthode. Il préparait d'abord les cultures pures par *inoculation en stries dans la gélatine nutritive*. Plus tard, il a élaboré une méthode bien meilleure, celle de la *culture sur plaques* (1883). Le procédé est le suivant : on prend une parcelle de la culture impure que l'on délaie dans une grande quantité d'eau stérilisée. Puis on introduit de nouveau un peu de ce liquide dans un ballon qui contient par exemple un mélange de bouillon et de gélatine chauffée à 30° C. On agite le ballon pour répartir les germes et on en répand le contenu sur une grande plaque de verre, que l'on recouvre ensuite d'une cloche. Peu après, la gélatine se fige et les germes se trouvent alors pris dans la masse solide. Au bout de quelques jours, ils se développent en colonies, en formant soit des points, soit des taches, visibles à l'œil nu. Selon Koch, la pureté des végétations

dans la gélatine est indiquée, pour ce qui concerne les bactéries, en partie par leur aspect, leur couleur, leur forme, etc.

Dans un examen plus approfondi, on n'aperçoit cependant aucune différence *essentielle* entre cette répartition des germes dans la gélatine liquide et celle que l'on obtenait précédemment par des dilutions dans des liquides. La même incertitude subsiste, car ni l'examen microscopique de l'aspect de la colonie, ni l'examen microscopique de son contenu, ne nous donnent la certitude qu'elle ne contienne *qu'une seule* espèce.

Le seul moyen de s'assurer de la pureté absolue d'une culture dans la couche de gélatine est d'observer directement le germe isolé et d'en suivre le développement.

Hansen l'a fait pour les cellules de levure et il a élaboré la méthode suivante : *la couche de gélatine formée par le liquide nutritif figé, est étalée de manière à ce que l'on puisse voir au microscope où se trouvent les germes isolés.* La position de ces germes est alors soigneusement marquée, et l'on est désormais à même de suivre pas à pas le développement et la multiplication de la cellule.

La plaque de verre est un couvre-objet d'à peu près 30 m/m de diamètre. Celui-ci est fixé sur un anneau de verre qui est lui-même placé sur un verre plus épais, et qui constitue donc une de ces chambres humides décrites précédemment (voir Fig. 2, page 11) qui est appropriée au but que l'on poursuit et qui porte à la surface inférieure du couvre-objet une couche solide de gélatine. Le point essentiel de la méthode de Hansen est donc que contrairement à Koch, il suit d'une manière conséquente le principe, que le point de départ d'une culture pure doit être une cellule unique. Les germes doivent être tellement répartis, qu'il ne s'en trouve que relativement peu dans la couche de gélatine; on laisse alors la chambre humide sous le microscope pour suivre directement la multiplication des germes, ou bien l'on note, en divi-

sant la plaque de verre en petits carrés ou en employant le marqueur, l'endroit où se trouvent les germes sûrement isolés, et l'on place l'appareil dans une étuve, jusqu'à ce que les colonies soient complètement développées. On peut avoir, à un couvre-objet, 50 à 60 germes bien isolés. Quand les colonies sont développées, elles doivent être introduites dans le ballon au moyen d'un fil de platine préalablement rougi. Pendant l'ensemencement, la culture se trouve un instant à l'air et exposée à l'infection. Mais sur ce seul point faible, le jeu du hasard est réduit à son minimum, si l'opération décrite a lieu dans un espace restreint, exempt de germes, par exemple dans une petite caisse à parois de verre assez grande pour abriter les appareils et les mains de l'opérateur (voir page 18). De cette manière, l'ensemencement de la colonie se fait avec toute la sûreté possible. Du premier ballon la culture pure peut être introduite sans infection dans des ballons toujours plus nombreux et plus grands. La méthode de Hansen s'est donc autant que possible rapprochée du but, et elle s'emploie par conséquent partout où l'on se livre à des travaux exacts de ce genre.

Déjà, en 1883, Hansen *a soumis la méthode des cultures sur plaques de Koch à un contrôle*. Il prépara un mélange de deux espèces de levures pouvant être distinguées au microscope, c'est-à-dire le *Saccharomyces apiculatus* et une espèce du groupe de *Saccharomyces cerevisiæ*. Le mélange fut introduit dans du moût gélatiné et, après avoir été agité, il fut répandu sur une plaque de verre. Près de la moitié des taches formées contenait chaque espèce isolée, et dans une tache on trouva les deux espèces.

Plus tard, M. Miquel (1888) a appliqué un contrôle semblable pour les bactéries. Il prit dans une culture sur plaques, provenant d'une analyse d'air, 100 colonies qui furent introduites dans 100 ballons contenant du bouil-

lon peptonisé. L'examen des végétations qui se développèrent dans ces ballons démontra que celles-ci contenaient 134 espèces différentes de microorganismes. Ceci provient sans doute de ce qu'en remuant le mélange gélatiné, il est très difficile, et souvent complètement impossible, de séparer toutes les bactéries et les autres germes les uns des autres. Cet examen prouve donc que la culture sur plaques employée pour les bactéries peut entraîner des erreurs considérables.

M. Holm (1891) a soumis, pour un grand nombre d'espèces de levures, la méthode à une analyse minutieuse, en employant pour la préparation de cultures absolument pures, le procédé de Hansen qui a été décrit plus haut. Le résultat de 23 séries d'essais effectués avec des mélanges distincts fut que dans un seul cas, 100 colonies avaient été formées par 100 cellules ; dans toutes les autres séries on trouva des erreurs. Dans le cas le plus défavorable 100 colonies avaient été formées par 135 cellules, et la moyenne de tous ces essais fit voir qu'en moyenne 100 colonies avaient été formées par 108 cellules. Par là, il est démontré que le procédé sur plaques est également défectueux pour la levure.

La méthode de Hansen pour la culture pure de la levure a donc, comme avantage sur celle de Koch son point de départ sûr. En répétant même plusieurs fois les cultures sur plaques, on ne sait cependant jamais si le but est réellement atteint ou non. En ce qui concerne les bactéries, il sera toutefois, dans la plupart des cas, impossible de s'assurer le point de départ d'une cellule unique Dans des cas pareils, la culture sur plaques de Koch est toujours la meilleure méthode dont nous disposions.

8. — Détermination du nombre des cellules de levure.

Dans la fabrication de la levure pressée et dans la distillerie, il est important de déterminer le *pouvoir de mul-*

tiplication des cellules pendant le développement de la levure. Il faut naturellement que cela se fasse en déterminant le nombre des cellules qui se trouvent, aux différentes phases de la fermentation, dans un volume déterminé du liquide fermentant. Des expériences de ce genre ont été entreprises surtout par MM. Delbrück, Hansen, Durst, Hayduck et Pedersen; une détermination du nombre des bactéries fut en particulier faite par Fitz.

Le comptage s'effectue au moyen de l'appareil construit par Hayem et Nachet (Fig. 7), que l'on employait d'abord pour le comptage des globules de sang (de là, nommé hématimètre). Ce fut feu le professeur Panum, à Copenhague, qui employa le premier cet appareil au comptage des micro-organismes, en vue de déterminer leur puissance de reproduction. L'hématimètre se compose, comme l'indique la figure, d'un porte-objet sur lequel est collé un couvre-objet *d'épaisseur connue* (par exemple 0,2 $^{m}/_{m}$), et dans le milieu duquel on a pratiqué une ouverture circulaire. On porte une petite goutte du liquide qui contient les cellules dans ce renfoncement; un couvre-objet se place sur l'ouverture et repose ainsi sur la lamelle de verre trouée. La goutte de liquide ne doit pas être assez grosse pour que cette pression lui fasse dépasser les limites de l'ouverture; mais elle doit cependant être assez haute pour toucher le couvre-objet superposé. On connaît alors l'épaisseur de la couche liquide. Afin de déter-

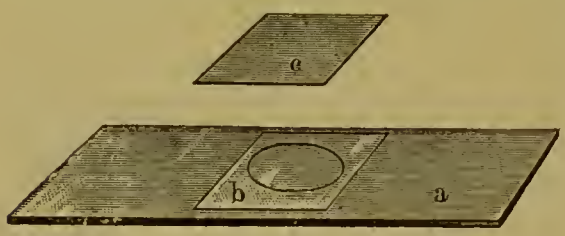

Fig. 7.

Hématimètre.

a Porte-objet.
b Couvre-objet avec ouverture circulaire fixé sur a,
c Couvre-objet.

miner les deux autres dimensions et de pouvoir ainsi opérer avec un *volume* connu de liquide, on introduit dans l'oculaire du microscope un de ces micromètres bien connus, fait d'une petite lame de verre, sur laquelle sont gravés par exemple 16 petits carrés. On connaît la valeur réelle d'un de ces carrés pour une combinaison donnée de lentilles, de sorte qu'en projetant l'image carrée sur l'objet, on délimite ainsi un prisme de volume connu. Dans certains cas, il est plus pratique de graver un système de carrés fins, de grandeur connue, sur le porte-objet, dans le renfoncement, comme l'a fait Zeiss à Iéna, sur les indications de Thoma. Par ce moyen, la mise au point du microscope sur les cellules qui se trouvent au fond de la chambre, sera également plus sûre.

Lorsqu'il ne s'agit que de déterminer la rapidité de la multiplication des cellules, c'est-à-dire d'indications répétées du nombre des cellules contenues dans *le même* volume, il est superflu d'en indiquer la grandeur et il suffira alors d'opérer toujours avec le même volume.

Il est toujours nécessaire que l'échantillon que l'on emploie représente la moyenne; il doit, dans la plupart des cas, être dilué et agité pendant assez longtemps pour qu'il se produise une répartition homogène des cellules: la densité du liquide doit être telle que les cellules puissent y rester suspendues pendant quelques instants. Au moyen d'un tube capillaire, on en aspire une goutte que l'on porte dans l'appareil à compter, et que l'on recouvre du couvre objet. On laisse reposer pendant quelques temps pour que les cellules puissent se déposer au fond de l'espace limité; c'est pourquoi la densité du liquide ne doit pas être plus grande qu'il n'est admissible, pour que cette précipitation se fasse en temps convenable. Le moût employé dans les brasseries remplit ordinairement ces deux conditions.

Si l'on voit que le volume que l'on envisage contient

trop de cellules pour qu'elles puissent être comptées exactement, il faudra diluer le liquide. Cela pourra également être utile sous d'autres rapports, soit pour prévenir la formation d'écume qui est souvent occasionnée par l'agitation du liquide, soit pour isoler les cellules qui sont souvent agglomérées et forment des colonies ou des grumeaux sans pouvoir être toujours séparées par l'agitation, soit enfin pour arrêter, au début de l'expérience, la fermentation et la reproduction des cellules de levûre.

Hansen constata que l'acide sulfurique dilué au 1/10 remplissait généralement ce but: l'acide chlorhydrique, l'ammoniaque et la soude caustique peuvent être employées, mais avec moins de succès.

Si l'on veut avoir une très forte dilution, on peut, après l'addition de 1 à 2 volumes d'acide sulfurique dilué, ajouter de l'eau distillée.

Si l'on mesure exactement les différents volumes des liquides, et surtout si l'on a soin de remuer fortement pendant longtemps pour bien répartir les cellules, on peut opérer avec une grande exactitude. Il faut toujours préparer deux dilutions égales et prendre des échantillons de chacune d'elles pour la numération. Il faut également déterminer par des expériences, dans combien de petits carrés il est nécessaire de compter les cellules, afin d'arriver à une moyenne aussi exacte que possible. On continue alors à compter et à déterminer de cette manière des moyennes jusqu'à ce que l'on obtienne des quantités n'ayant aucune influence sur la valeur moyenne. Le nombre des déterminations nécessaires, et en général leur exactitude, dépendent de l'expérience de celui qui opère et du soin qu'il y apporte. Hansen a constaté qu'il suffisait ordinairement de compter les cellules dans 48 ou 64 petits carrés.

CHAPITRE II

ANALYSES DE L'AIR ET DE L'EAU.

De même que l'eau était considérée autrefois, dans l'industrie de la fermentation, comme un des éléments les plus énigmatiques auquel on attribuait souvent les irrégularités qu'on ne pouvait pas s'expliquer autrement, de même l'air fut de tous temps considéré comme l'origine d'un grand nombre de particularités dans les résultats des observations faites en tel ou tel endroit. A la base de cette idée, se trouvait le vague pressentiment que cet air invisible contenait des substances qui avaient une action préjudiciable sur nos opérations ; mais quelle était la nature de ces substances, et comment on pouvait en acquérir une connaissance plus approfondie? ce furent des points qui restèrent dans l'obscurité la plus complète jusqu'aux temps les plus récents. Les analyses chimiques de l'air datant depuis plus d'un siècle, ne donnèrent aucun éclaircissement à ce sujet.

Peu à peu, un nouvel élément vint s'y ajouter. Il fut irréfutablement démontré que l'air n'était pas partout également propice à la nature humaine, qu'il pourrait bien s'y trouver quelque chose qui attaque notre organisme. Ces corps inconnus furent appelés « miasmes » (mélanges), nom qui fut pris dans un sens purement chimique. Mais comme l'existence de ces mélanges n'était

pas établie d'une manière exacte, la science n'en était pas plus avancée.

Les découvertes de Spallanzani et de ses successeurs sur la génération spontanée, mentionnées dans le chapitre précédent, dirigèrent les recherches dans une voie toute nouvelle, c'est-à-dire vers l'étude des organismes microscopiques L'importance capitale des microorganismes pour l'industrie de la fermentation fut rendue évidente par Pasteur, qui démontra que l'air contenait des bactéries ainsi que des ferments alcooliques.

Les questions qui se posent maintenant sont: quelle est la nature de ces germes suspendus dans l'air? A quel degré dans quelle étendue se présentent-ils dans l'espace? Leur nombre et leurs espèces varient-ils dans les différentes saisons de l'année? Enfin ont-ils vraiment une action notable sur la fabrication?

Il sera intéressant de jeter un coup d'œil sur les différents procédés employés pour analyser l'air au point de vue des germes qu'il contient.

La plupart des *analyses de l'air* avaient pour but d'apporter de la lumière dans l'obscurité mystérieuse qui enveloppe la plupart des maladies contagieuses, qui sont presque toutes dues à l'action d'organismes microscopiques. Pour les organismes de la fermentation, il existe des recherches de Pasteur, et de plus récentes surtout de Hansen. Le savant français fit voir que ces germes étaient toujours suspendus dans l'air; cependant on les trouve généralement déposés en bien plus grande quantité sur les ustensiles servant aux expériences. Les véritables ferments alcooliques sont relativement peu nombreux dans l'atmosphère, tandis que les germes des moisissures y sont plus répandus. Pasteur démontra également, comme le fit plus tard Tyndall, que les germes contenus dans l'atmosphère variaient tant au point de vue de leur nombre qu'à celui de leurs espèces. Pasteur obtint ces ré-

sultats en plaçant dans différents endroits des cuvettes plates à grande surface, remplies de moût de bière, de moût de raisin ou d'eau de levure sucrée ; au bout de quelques jours, on examinait le contenu de ces cuvettes au microscope. Pasteur employa encore dans ce but des ballons renfermant de l'air raréfié, appelés ballons à vide. En ouvrant le ballon, l'air y pénétrait avec ses germes.

Le savant qui, pendant les dernières années a, sans contredit, entrepris le plus grand nombre d'analyses de l'air, est M. Miquel, directeur du laboratoire de Montsouris, près de Paris, installé tout spécialement dans ce but. Son collaborateur, M. Freudenreich, a également fourni des travaux très précieux dans le même ordre d'idées.

M. Miquel fit ses premières analyses au moyen de l'appareil nommé *aéroscope* (Fig. 8) qui est construit de la manière suivante. Du sommet d'une cloche A part un tube C servant à aspirer de l'air, qui traverse ainsi la cloche. Un cône creux, dont l'ouverture B est tournée vers le bas, est engagé dans la cloche par un pas de vis ; au sommet de ce cône D se trouve une petite ouverture qui permet à l'air aspiré de sortir.

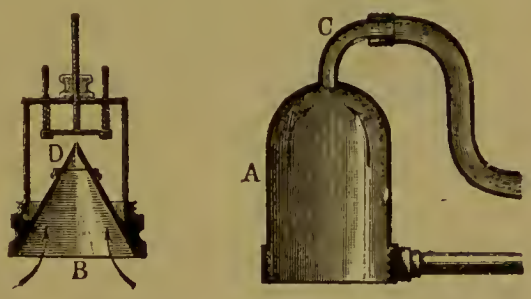

Fig. 8.
Aéroscope.

Immédiatement au-dessus du cône, en regard de cette petite ouverture, est située une plaque de verre mince recouverte d'un mélange de glycérine et de glucose. Les corpuscules que l'air entraîne seront retenus en partie par ce mélange visqueux. Les microorganismes qui s'y déposent doivent être répartis aussi également que possible sur la plaque de verre pour être ensuite comptés au

microscope. Cette méthode est défectueuse en ce sens, qu'elle ne nous fournit aucune donnée sur le point le plus important, savoir, sur le nombre et sur la nature des germes retenus, vraiment susceptibles de développement.

Pour déterminer le nombre et l'espèce des germes susceptibles de développement, M. Miquel emploie maintenant l'appareil suivant (Fig. 9). Dans le ballon A est scellé le tube R dont l'extrémité inférieure est effilée et touche presque le fond; la partie supérieure de ce tube porte un chapeau rodé H muni d'un tube qui renferme un filtre stérile de ouate, d'amiante ou de coton de verre (as). Le ballon porte d'un côté un tube étranglé au milieu (Asp), dans lequel se trouvent deux bouchons de ouate W' et W. De l'autre côté le ballon porte également un tube de verre qui est relié par un tube en caoutchouc k, au tube de verre B, étiré en pointe et fermé à la lampe. On introduit de l'eau distillée dans le ballon, puis tout l'appareil est stérilisé. Lorsqu'on veut s'en servir, on met la tubulure Asp en communication avec un aspirateur, par exemple avec une bouteille remplie d'eau et munie à sa partie inférieure d'un robinet d'échappement, le chapeau H est enlevé, puis l'air entre par l'ouverture O, et passe lentement sous forme de petites bulles à travers l'eau G, pour ressortir par les tampons de ouate du tube Asp. Tous les germes de l'air n'étant pas retenus dans l'eau pendant le barbotage, le tampon de ouate W doit arrêter ceux qui ont été entraînés. L'aspiration terminée, on replace le chapeau H. En soufflant par la tubu-

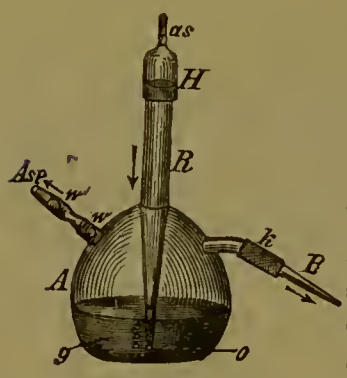

Fig. 9.

Appareil de Miquel pour les analyses de l'air.

lure latérale Asp, on fait monter le liquide dans le tube R, pour qu'il recueille les germes qui auraient pu y adhérer. Puis en soufflant plus fortement, on pousse le tampon de ouate intérieur W dans le liquide, pour y disséminer les germes qu'il avait retenus. Après avoir purifié le tube éffilé B dans une flamme, on en casse la pointe, puis on verse le liquide, en soufflant par la tubulure latérale Asp, dans un certain nombre de ballons renfermant du bouillon stérilisé.

Il s'agit ici de s'assurer, par des expériences préalables, jusqu'à quel degré on doit pousser la dilution du liquide infecté par l'air, pour qu'un certain nombre (par exemple la moitié) des petits ballons infectés restent stériles. Ou bien l'on peut aussi immédiatement diluer à différents degrés plusieurs échantillons de l'eau, et en infecter plusieurs séries de ballons. Si un certain nombre de ces ballons ne montre pas de développement, il y aura un certain degré de probabilité pour *que dans chacun des autres ballons, dans lesquels il se produit une végétation, il n'ait été introduit qu'un seul germe.* On peut alors, par un simple calcul, déterminer le nombre des germes susceptibles de développement dans le milieu employé, qui se trouvaient dans le volume d'air aspiré par le ballon original (ensemencement fractionné).

Par ces méthodes de recherches, M. Miquel trouva que des volumes égaux d'air, pris au même endroit, à des époques différentes, contenaient un nombre différent de bactéries. Une pluie prolongée purifie à un haut degré l'air de bactéries, et le nombre de celles-ci diminue tant que la terre reste humide, pour augmenter de nouveau progressivement avec le dessèchement du sol. Dans les saisons sèches, les bactéries sont donc, dans la règle, plus nombreuses, tandis que les moisissures, qui croissent le mieux dans l'humidité et dont les organes reproduc-

teurs s'élèvent librement dans l'air, abondent le plus dans l'atmosphère pendant ces périodes humides. On trouve l'air le plus pur en hiver; l'air de la ville est moins pur que celui de la campagne; un air exempt ou presque exempt de germes se trouve à la mer ou sur les hautes montagnes. Dans certains endroits, comme par exemple dans les hôpitaux, l'atmosphère se montra très riche en bactéries, ainsi dans un cas, 50 fois plus riche qu'au jardin de Montsouris.

Une méthode toute différente pour l'étude des organismes de l'atmosphère est celle qui est employée dans le laboratoire de Koch, et que M. Hesse développa d'une manière plus complète. Un tube de verre d'environ 1 mètre de longueur et de 4 à 5 centimètres de diamètre, est muni à un bout d'une membrane de caoutchouc perforée, recouverte elle-même d'une seconde membrane non-perforée. On verse un peu de mélange de gélatine liquéfiée dans le tube, puis on bouche son autre extrémité avec un bouchon en caoutchouc, qui est traversé par un tube de verre contenant un tampon de ouate. L'appareil entier est alors chauffé suffisamment pour être rendu stérile, puis le tube est couché horizontalement pour que la gélatine, en se figeant, forme une couche dans la partie inférieure du tube. Quand on veut analyser l'air, on enlève le capuchon de caoutchouc, et l'on aspire lentement l'air par le tube. Les germes de l'atmosphère se déposent sur la gélatine et, l'aspiration terminée, on referme le tube et on le place dans un thermostat. Là, quelques-uns de ces germes produisent des colonies visibles qui peuvent facilement être comptées. En opérant avec un courant d'air suffisamment faible, on verra que les bactéries, qui souvent voltigent dans l'air, agglomérées en amas plus ou moins compactes, par exemple accrochée à des grains de poussière, à des filaments ou à de petits débris, sont plus vite précipitées

que les spores des moisissures. C'est pourquoi la gélatine contient, en général, dans la partie antérieure du tube spécialement des colonies de bactéries, tandis que les spores des moisissures se développent surtout dans la partie postérieure.

MM. Hueppe, von Schlen et d'autres employèrent pour les analyses de l'air de la gélatine liquéfiée, au travers de laquelle l'air était aspiré, et qui était ensuite étalée sur des plaques de verre.

MM. Frankland, Miquel et Petri, emploient des corps poreux solides pour la filtration de l'air dans des buts analytiques, par exemple de la poudre de verre, du coton de verre, du sable, du sucre, etc. Le *filtre de sable* dont se sert M. Petri, a 3 centimètres de longueur et 1,8 centimètres d'épaisseur. On le remplit de sable calciné fortement tassé, dont les grains ont une grosseur de 0,25 à 0,5 millimètre. On place deux de ces filtres l'un derrière l'autre, dans un tube de verre. Le premier filtre est destiné à retenir la poussière renfermant les germes qui entrent avec l'air aspiré; le second filtre sert à contrôler le premier. Le sable infecté de germes se répartit dans des boîtes de verre plates, puis on l'arrose de gélatine liquéfiée. Les poussières infectées donnent alors naissance à des colonies dans la gélatine.

Ces filtres à air pourront servir à l'expédition des échantillons d'air. Le destinataire pourra laver le sable dans de la gélatine ou encore mieux dans de l'eau stérilisée. Après avoir fortement agité l'eau, on l'emploiera immédiatement à l'ensemencement, goutte à goutte, dans des ballons renfermant un liquide nourricier, ou pour des cultures sur plaques.

Se basant sur de nombreuses expériences, M. Miquel fait contre l'emploi des plaques de gélatine dans ce but, l'objection que beaucoup de bactéries demandent une incubation de 15 jours dans la gélatine, si elles sont

exposées à une température de 20 à 22°, avant de produire des colonies distinctes. Mais d'autre part, il y a des espèces qui auront très rapidement liquéfié la gélatine, de sorte qu'elles rendront impossible des observations poursuivies pendant quinze jours. C'est aussi le cas pour les moisissures qui, en peu de jours, peuvent se propager sur toute la plaque. On est, par conséquent, forcé de compter les colonies dans une phase si jeune de leur développement, que beaucoup d'entre elles ne seront pas encore suffisamment apparentes. Un autre inconvénient des plaques de gélatine est que l'on ne peut pas faire que le développement s'effectue à une température plus élevée que 23 à 24° C., parce que la gélatine devient liquide à cette température; or, beaucoup d'espèces de bactéries ne présentent un développement distinct qu'à des températures bien plus élevées. D'autres espèces ne se développent pas du tout dans la gélatine, mais seulement dans des liquides. Enfin, on fait ressortir comme une objection essentielle contre les plaques de gélatine, que beaucoup de colonies se composent de plusieurs espèces (voir page 38-39), ce que M. Miquel démontra en introduisant chaque colonie à part dans du bouillon de peptone, et en préparant des plaques des ces végétations. Cela provient aussi en partie — comme le fait remarquer M. Petri — de ce que les bactéries se présentent souvent dans l'atmosphère sous formes d'agglomérations qui se déposent directement sur la plaque de gélatine, ou qui sont mêlées à la gélatine épaisse, dans laquelle il sera toujours très difficile de séparer les individus en agitant.

Hansen fit ses analyses de l'air entre 1878 et 1882. Le but principal qu'il poursuivait était de fournir des lumières à l'industrie de la fermentation. Comme l'on sait, ses recherches sur le *Saccharomyces apiculatus* (1880) se basent sur des travaux de ce genre. Comme la question

concernait les organismes qui se présentent dans la brasserie, le choix du moût ordinaire comme liquide nutritif était tout indiqué. Les appareils employés étaient soit des ballons à ébullition ordinaires, recouverts de plusieurs couches de papier à filtrer passé préalablement par une flamme, dont on faisait bouillir le contenu pendant quelque temps, soit des ballons dans le genre des ballons à vide de Pasteur, dont le col était effilé et que l'on fermait à la cire pendant la cuisson. A l'aide d'un couteau à verre, on entamait la partie effilée un peu au-dessous de la pointe, afin de pouvoir la casser plus facilement pour donner accès à l'air.

Lorsque ces ballons étaient pleins d'air à analyser, on les refermait de nouveau à la cire et on les agitait fortement pour mélanger le contenu de l'air aspiré avec le liquide. On les laissait ensuite reposer pendant un temps plus ou moins long — jusqu'à six semaines — puis on les examinait au microscope.

Hansen trouva souvent, par cet examen, que le moût restait clair et invariable en apparence, malgré qu'un développement ait eu lieu. On ne peut donc se fier ici à un examen à l'œil nu. Parmi les formes qui, à un degré peu avancé de développement, ne sont pas visibles à l'œil nu, il cite les suivantes : *Aspergillus*, *Mucor*, *Penicillium*, *Cladosporium*, *Bactérium aceti* et enfin le *Mycoderma cerevisiæ*. Même quand ces organismes ont formé de vigoureuses végétations, le liquide nourricier mentionné plus haut restera clair.

Il trouva de plus, que par l'emploi de ces ballons, on obtenait souvent des cultures pures, parce qu'une seule espèce avait pénétré avec l'air dans le petit ballon. Il était très rare que trois ou quatre espèces se trouvassent en même temps dans le même ballon. Cela provient de ce que chaque ballon ne reçoit qu'un petit volume d'air. Les avantages paraissent évidents. On n'arrive réellement à

reconnaître ces différents germes que lorsqu'ils se sont développés; dans le cas où plusieurs germes pénétreraient dans le même ballon, le germe le plus vigoureux arrêterait probablement les autres dans leur développement, de sorte que ces derniers ne seraient pas aperçus dans un examen ultérieur. Mais ce procédé nécessite en même temps le débouchage d'un grand nombre de ballons, ce qui rend cet examen compliqué et coûteux. Comme ces ballons ne nous renseignent que sur ce qui se trouvait dans l'atmosphère au moment du débouchage, on employait les matras à ébullition comme auxiliaires, en les laissant plus longtemps, jusqu'à 48 heures, reposer à la même place.

Après ces remarques préliminaires, donnons un court résumé des résultats obtenus par Hansen.

Il confirme les lois énoncées d'abord par Pasteur, à savoir que l'air de divers *lieux voisins pouvait en même temps contenir des nombres différents et des espèces différentes d'organismes*. Il trouva que cette règle s'appliquait aussi à des endroits voisins dans un seul et même jardin. Comme autres traits caractéristiques et significatifs pour la dissémination des organismes, Hansen cite que par exemple certains organismes, qui se trouvaient en abondance sous les cerisiers d'un jardin, dans la première moitié de juillet, y faisaient complètement défaut dans la seconde moitié du mois ; puis que certains organismes, qui se montraient à certaine époque sous les cerisiers et non sous les vignes, ne se trouvaient plus tard que sous ces dernières. Comme preuve pour l'inégalité de la répartition des organismes, il nous montre que les ballons de la même série d'expériences, ouverts à la même place, offraient souvent des contenus les plus variés.

Les expériences faites avec les ballons à vide ont en outre démontré que les organismes de l'atmosphère *forment souvent des groupes ou des nuages* alternant

avec des espaces exempts de germes, ou n'en contenant que très peu d'isolés. Comme les organismes ne peuvent se produire dans l'air, mais qu'ils ont leurs foyers sur la terre, il en résulte que leur présence dans l'atmosphère doit dépendre des conditions de la surface de la terre, qui, à leur tour, dépendent, à certains points de vue, du temps.

Les nombreuses analyses de Hansen ont en outre démontré *que les Saccharomyces se présentent relativement rarement dans les poussières de l'air*. Leur nombre augmente dans l'atmosphère de juin en août de telle manière, qu'à la fin d'août et au commencement de septembre, les ballons sont souvent infectés par ces ferments, après quoi survient une diminution. Les microorganismes de cette espèce dans l'air libre, qui pénètrent dans les ballons à d'autres époques de l'année, doivent être considérés comme peu importants et accidentels, et n'entrent pas dans la règle générale. Comme la plupart des *Saccharomyces*, tel que le *Saccharomyces apiculatus*, passent selon toute probabilité l'hiver dans la terre et ont leur foyer de production sur les *fruits doux et juteux*, il s'ensuit que ces derniers doivent être considérés comme la principale source de l'infection. A la même époque de l'année, les *bactéries* se trouvent également en plus grande abondance. Ceci constitue un danger réel pour la fabrication, car le moût, qui est répandu en couches minces sur les bacs, est exposé à cette époque à une forte infection de la part des germes de l'air.

Dans les ballons, les bactéries sont un peu plus abondantes que les *Saccharomyces*, et *les moisissures apparaissent en nombre encore plus grand*. Parmi ces dernières, on trouve dans les jardins surtout le *Cladosporium* et le *Dematium*, puis le *Penicillium*, plus rarement la *Botrytis*, le *Mucor* et l'*Oïdium*.

Après que Hansen a ainsi démontré quelles sont les

espèces de microorganismes de *l'atmosphère* qui sont susceptibles de développement dans les ballons renfermant du moût stérilisé, il nous communique les résultats de ses examens *des différents locaux d'une brasserie* en général.

Quand les *drèches* sont exposées à l'air libre, elles dégagent, comme l'on sait, des vapeurs acides. Comme les drèches contiennent toujours un fort développement de bactéries, la question suivante se pose d'elle-même : quelle est la composition de l'air dans le voisinage des tas de drèche ? Hansen trouva que seulement 30 0/0 des ballons ouverts dans ces vapeurs étaient infectés, savoir 3,6 0/0 par des *Saccharomyces* et 2,4 0/0 par des bactéries, tandis que des expériences parallèles faites dans le jardin donnèrent une infection d'environ 44 0/0, dont 8,5 0/0 par des bactéries. L'air du voisinage des tas de drèche était donc moins riche en bactéries que celui du jardin. Comme partout ailleurs, ce furent les moisissures qui occasionnèrent l'infection la plus abondante. Après un examen plus approfondi, Hansen conclut que sans nul doute, aucun des organismes apparaissant dans les ballons ne provient des drèches elles-mêmes. En tous cas, la grande richesse des drèches en bactéries ne répond pas au résultat mentionné ci-dessus, qui doit, selon toute probabilité, être expliqué ainsi, que dans la règle l'air ne tire des *surfaces humides*, aussi peu ici que dans d'autres cas, un contingent quelconque d'organismes.

Mais ceci ne doit pas être mal compris, et faire croire que l'on peut impunément entasser les drèches dans n'importe quel endroit et, après leur éloignement, en laisser les restes exposés aux intempéries de l'air ; il est évident qu'il en résulterait un grand danger. Quand ces résidus se dessèchent et voltigent sous forme de poussière dans l'air, une multitude de germes de bactéries sont soulevées en même temps, ce qui constitue, sans

nul doute, une source de nombreuses infections de bactéries. C'est pourquoi les endroits où il aura séjourné de la drèche pendant un certain temps, doivent être lavés à l'eau de chaux ou plutôt de chlorure de chaux [1].

Dans un corridor conduisant à la chambre où *se versait l'orge*, les ballons reçurent la plus forte infection qui fut jamais obtenue ; cet air était surtout riche en *bactéries*.

L'air des *germoirs* était également caractéristique; il contenait toujours une très forte *végétation de moisissures* Dans le cas dont il s'agit, cette végétation provenait de l'*Eurotium aspergillus glaucus*, qui était ordinairement rare. Sur le malt lui-même se présente comme toujours de préférence le *Penicillium glaucum*.

Le plus grand intérêt se rattache cependant à l'examen des différentes *salles de fermentation*, soit du Vieux-Carlsberg, soit de la brasserie » N ». Dans les premières, l'air était plus pauvre en organismes que dans tous les autres locaux examinés pendant cette analyse, par contre, un grand nombre de ballons fut infecté dans les caves de fermentation de la brasserie » N » (55,75 jusqu'à 100 p. cent). Les organismes qui se présentèrent dans l'air de ces caves furent: le *Saccharomyces cerevisiæ*, le *Mycoderma cerevisiæ*, le *Saccharomyces pastorianus*, le *Saccharomyces ellipsoideus*, les *Torula* de Pasteur et d'autres cellules semblables aux levures, puis les *Penicillium*, *Dematium*, *Cladosporium* et enfin des bactéries. Hansen put donc, par un heureux hasard, mettre en évidence les contrastes suivants, qui existaient dans l'état de l'air, dans les locaux les plus importants des deux

(1) Par le traitement des drèches dans les *appareils à sécher*, les germes *ne sont pas tués*. Ces appareils occasionneront donc des dangers très sérieux pour la fabrication, si les drèches séchées peuvent transmettre leurs nombreuses bactéries au moût des bacs.

établissements industriels cités: d'un côté, un air presque exempt de germes, de l'autre un air fourmillant de germes. Il est hors de doute que le produit de la fabrication a dû aussi se ressentir de l'état dans lequel se trouvaient à cette époque les locaux nommés en dernier lieu, et nous nous trouvons ici en présence d'un des faits les plus importants, quand on envisage la chose au point de vue du praticien. *L'air de la cave de fermentation peut contenir tout un monde de ces germes qui attirent les plus grandes calamités dans l'industrie de la fermentation;* toutefois, il est possible de le maintenir vierge de tous ces germes, et il est hors de doute que d'une part la purification de l'air pénétrant dans la salle de fermentation par le passage à travers d'un bain d'eau salée, de l'autre part l'ordre et la propreté exemplaire, très sévèrement observés dans les caves de la brasserie du Vieux-Carlsberg, sont en rapport direct avec les résultats mentionnés plus haut. Les recherches de Hansen contiennent donc encore un avertissement qui ne saurait être assez répété.

Se basant sur un grand nombre d'analyses comparées, Hansen indiqua la méthode suivante pour l'analyse zymotechnique de l'air et de l'eau.

Le principe servant de base à cette analyse de l'air et de l'eau, ressort de ceci : pour l'industrie pratique, comme par exemple la brasserie, il est seulement important de savoir, *si l'air ou l'eau contiennent des germes susceptibles de se développer dans le moût ou dans la bière.* Mais cela ne peut pas, comme on le croyait autrefois, être établi par la gélatine nutritive[1] employée dans l'analyse hygiénique de l'air et de l'eau. Contrairement à l'hygiéniste, le zymotechnicien a l'avantage de *pouvoir opérer directement*, avec le même liquide que l'on utilise

(1) Gélatine mélangée d'extrait de viande et de peptone.

dans la pratique, c'est-à-dire avec le moût. *Tous les germes de maladie reconnus jusqu'ici avec certitude dans la bière peuvent également se développer dans le moût. Les expériences comparées de Hansen ont montré d'une façon évidente, que l'emploi des gélatines introduisait de très graves erreurs.* Ainsi, dans une série d'analyses comparées d'échantillons d'eau correspondants, les ensemencements dans de la gélatine nutritive de Koch donnèrent par exemple 100, 222, 1000, 750 et 1500 végétations dans 1 cm³ d'eau; tandis que dans le moût ils ne donnèrent que 0, 0, 6,6, 3 et 9 végétations, et enfin dans la bière ces échantillons d'eau donnèrent tous 0 végétation. Dans une autre série, la gélatine de Koch donna pour 1 cm³ d'eau 222 végétations, le moût gélatiné en donna 30, mais aucun des ballons renfermant du moût et de la bière, et qui furent ensemencés avec de cette eau ne présentèrent un développement. Dans ces cas, il ne se développa donc de cette multitude des germes vigoureux de l'eau, qu'un très petit nombre, ou aucun, dans le moût ou dans la bière.

Hansen a de plus démontré qu'il était faux d'employer d'abord la gélatine dans les analyses zymotechniques de l'air et de l'eau, et de semer ensuite les colonies formées dans des ballons contenant du moût. Il fut ainsi démontré par l'expérience que plusieurs des germes de bactéries qui se trouvent dans la poussière de l'air et dans l'eau, peuvent, il est vrai, se développer dans la gélatine nutritive, mais non dans le moût; mais parmi ces espèces, il en existe quelques-unes qui, après avoir formé une végétation nouvelle dans la gélatine, sont tellement fortifiées, qu'elles arrivent à se développer dans le milieu nourricier moins favorable qu'offre le moût. On est donc trompé dans ces cas. Une objection plus sérieuse encore contre le procédé sur gélatine, est que quelques organismes particulièrement importants pour nous *n'arrivent*

pas à se développer, lorsqu'on les introduit directement dans la gélatine, dans l'état affaibli dans lequel ils se trouvent ordinairement dans la poussière de l'air et dans l'eau.

Se basant sur ces observations, Hansen indiqua le procédé suivant : une série de flacons Freudenreich contenant du moût stérilisé et de la bière stérilisée sont ensemencés avec de petites quantités de l'eau à analyser que l'on emploie, selon les circonstances, diluée ou non diluée (1). On examine les flacons de culture après les avoir laissés reposer pendant 15 jours à une température de 25° C. Si une partie seulement de ces flacons présente un développement, tandis que les autres sont restés stériles, on peut admettre avec une certitude suffisante que chacun des premiers n'a reçu *qu'un seul germe*. Cela fournit des éclaircissements sur le nombre de germes susceptibles de reproduction qui se trouvent dans un certain volume, et cela donne en même temps aux différents germes des conditions plus favorables pour leur libre développement. L'examen exact nous renseigne alors sur la nature de ces germes.

Quoique par cette méthode, les cultures dans le moût donnent, en comparaison des cultures sur plaques, seulement un très petit nombre de végétations, *le nombre des végétations dans le moût sera néanmoins dans bien des cas trop élevé*, parce que dans les ballons, ces végétations peuvent se développer librement, sans concurrence. Quand le moût a été introduit avec de la bonne levure de culture dans la cuve de fermentation, un grand nombre de ces germes ne peut plus se faire valoir. En outre, les ballons qui offrent la formation de moisissures n'auront d'importance que pour la malterie,

(1) Dans les analyses de l'air, les germes s'introduisent moyennant un aspirateur, directement dans l'eau, ou d'abord dans du coton et ensuite dans de l'eau.

et non pas pour la brasserie proprement dite. Pour se rapprocher, dans l'étude des résultats, des conditions qui existent dans la pratique, on opère, d'après Hansen, de la manière suivante: *les ballons infectés de levures et de bactéries* se partagent en deux groupes: 1° ceux dans lesquels les végétations se sont montrées rapidement, et 2° ceux dans lesquels le développement n'apparaît que plus tard, par exemple cinq jours après l'ensemencement. Ces derniers contiennent des espèces qui se développent plus difficilement dans le moût; celles-ci seront donc ordinairement réprimées dans la fabrication à cause de la concurrence avec la levure, et par conséquent elles auront une importance secondaire dans l'analyse de l'air ou de l'eau. MM. Holm, Wichmann, et d'autres ont exécuté des analyses d'après ce procédé.

Pour le contrôle des filtres à air et à eau, on emploie de préférence le procédé sur gélatine de Koch.

CHAPITRE III

LES BACTÉRIES

A mesure que nos connaissances sur les bactéries s'étendent, la difficulté d'en donner une définition générale augmente. On les connaît sous toutes les formes, depuis les plus petits points ou globules jusqu'aux filaments verts semblables aux algues, et ils se trouvent à peu près partout, dans les conditions les plus variées comme cause soit de la décomposition ou de la putréfaction (saprophytes), soit de maladies (formes pathogéniques), soit enfin de la fermentation (formes zymogéniques).

On fit la connaissance de ces formes en plaçant de petites quantités de substances les plus variées sous le microscope et en les observant avec de forts grossissements. Dans la viande en putréfaction, on trouva des corpuscules sphériques qui se multipliaient évidemment en se partageant suivant un diamètre; le lait tourné offrit des corps courts, ayant la forme de bâtonnets; dans des substances végétales en décomposition on trouva des corps sphériques plus gros et de longs fils fins; dans la salive, au contraire, on vit des fils très fins enroulés en spirale et repliés, etc. Il était par conséquent tout d'abord indiqué de s'en tenir à ces *formes* et de les décrire comme autant *d'espèces* distinctes, C'est principalement à Cohn que revient une part de mérite

sous ce rapport, car on lui doit d'avoir établi la première classification systématique des bactéries.

Nous allons d'abord considérer de plus près les formes et les individus. Comme cela a été dit plus haut, les bactéries se présentent sous la forme la plus simple comme des corps sphériques de grandeurs différentes, jusqu'à ceux qui ne s'aperçoivent plus qu'avec les grossissements les plus puissants, et qui ne se manifestent

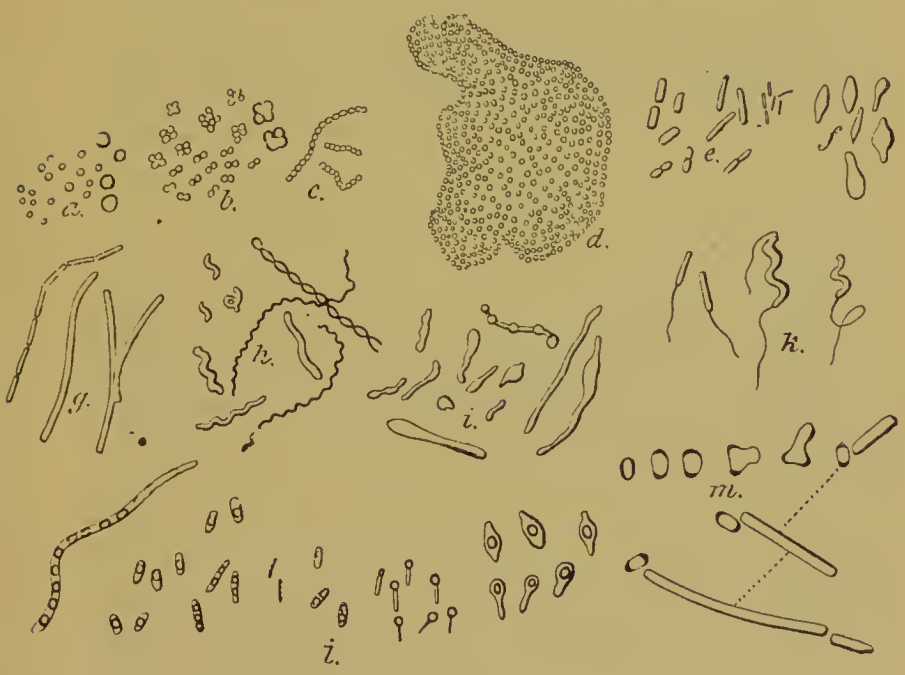

Fig. 10.

Formes de croissance des bactéries : **a** coques, **b** diplocoques et formes de sarcina, **c** streptocoques, **d** forme de zooglées, **e**) bactéries et bacilles, **f** types de clostridium, **g** faux-fils, leptothrix, cladothrix, **h** vibrion, spirille, spirochètes et spirulina, **i** formes d'involution, **k** bacilles et spirilles avec prolongements en forme de cils, **l** types de bactéries formant des spores, **m** germination d'une spore de bactérie.

comme êtres vivants plus que par leur multiplication par cloisonnement. On distinguera donc ce que l'on nomme les *macrocoques* des *microcoques* (Fig. 10 a). Quand les

petites sphères se présentent par couples de deux, on les nomme *diplocoques* (b); elles peuvent aussi apparaître par groupes de quatre — formes de *sarcina* (b) — ou bien former plusieurs rassemblements irréguliers, ou enfin des chaînes — *streptocoques* (c). Par une transition graduelle, les formes de coques se changent en celles des bâtonnets — *bactéries*, *bacilles* (e) — qui peuvent se présenter en différentes grandeurs, longueurs et grosseurs; quand les bâtonnets offrent un renflement au milieu, ce qui les fait ressembler à un fuseau, il se produit le type *clostridium* (f). Un prolongement plus fort des bacilles fait naître les filaments — *leptothrix* (g) — qui peuvent à leur tour se présenter par la jonction dans le sens longitudinal de plusieurs bacilles, comme *faux-fils* (g), ou comme ramifications apparentes par une réunion particulière de plusieurs filaments — *cladothrix* (g). — De véritables ramifications comme celles qu'offrent les moisissures ne se trouvent pas chez les bactéries. Souvent les bacilles et les filaments sont ondulés ou tournés en forme de vis (h); quand les spires sont peu prononcées, on a la forme des *vibrions*; quand elles sont plus accentuées, on a les formes des *spirilles* et *spirochètes*; quand les fils s'entrecroisent comme des tresses, on nomme cette forme *spirulina*. On peut encore signaler les formes bizarres irrégulièrement gonflées ou echancrées, que peuvent affecter plusieurs bactéries sans que la cause en soit exactement connue — les formes *d'involution* (i). —

Choisissons maintenant une de ces formes pour la soumettre à un examen plus approfondi avec un grossissement d'environ mille fois. Comme toute autre cellule, elle contient du protoplasma, une masse homogène, peu réfringente, dans laquelle peuvent se présenter ça et là de petites granulations, visibles surtout lorsque la cellule ne se trouve pas dans un état de développement très avancé. Quelquefois il se trouve au milieu de la cellule

une place plus claire que l'on doit envisager, par analogie aux plantes supérieures, comme un réservoir de suc, une vacuole. Quelques bactéries contiennent aussi certaines substances solides dans leur plasma, ainsi on trouve des globules de soufre dans certaines bactéries vivant dans de l'eau sulfurée. Il y a quelques espèces dont le plasma peut être, dans certains cas, coloré en bleu par de l'iode, ce qui permet d'admettre la présence de substances amylacées.

Ce protoplasma est entouré d'une *paroi cellulaire ou membrane*. Un examen par voie de colorations montre ordinairement que les couches extérieures de cette membrane sont gonflées et forment une masse gélatineuse, ce qui ressort tout particulièrement quand des flocons entiers de bactéries se trouvent amassés. Au point de vue chimique, il faut provisoirement admettre que la nature de cette membrane diffère en raison des différentes espèces. Il y en a où elle nous rappelle la cellulose des plantes supérieures, et d'autres au contraire où sa composition paraît ressembler plutôt à celle des matières albuminoïdes.

Beaucoup de bactéries contiennent des *matières colorantes* bleues, rouges, jaunes ou vertes, qui peuvent produire des colorations très intenses. Mais vue au microscope, la bactérie isolée n'apparaît que très faiblement colorée. Il n'a pas encore été déterminé exactement dans quelle partie la matière colorante se trouve située. Quelques variétés se distinguent par leur propriété d'être *luisantes* lorsqu'elles se trouvent dans certaines conditions de nutrition.

Une propriété remarquable de beaucoup de bactéries est leur *mouvement spontané*. Celui-ci s'effectue soit rapidement soit avec lenteur, les bactéries oscillant ou tournant autour de leur axe longitudinal en décrivant des courbes déliées ou étroites. Un fort grossissement permet

d'observer chez quelques-unes de ces formes mobiles des prolongements en forme de cils très fins (fig. 10 k) ; mais on n'a pu encore déterminer jusqu'à quel point ceux-ci doivent être considérés comme organes de locomotion, ni s'ils partaient de la membrane ou du contenu cellulaire.

La *multiplication* des bactéries s'effectue par *cloisonnement* qui a été observé dans ses détails chez les formes relativement grandes: il se forme de fines cloisons transversales qui augmentent peu à peu d'épaisseur et deviennent gélatineuses; alors les fils se fractionnent suivant ces membranes transversales (fig. 10 g). Bien avant qu'il soit possible d'observer les traces de ces membranes transversales on peut, par la coloration du fil, reconnaître qu'il se compose d'une série de segments, dont chacun correspond à un des individus formés plus tard. Les filaments nouvellement formés se trouvent alors tous dans un même plan. Il n'y a que quelques microcoques (les formes de sarcina) pour lesquelles on ait observé une division suivant deux ou trois directions de l'espace.

Par l'étude des formes de développement des bactéries effectuée de la manière indiquée plus haut, il a été démontré, principalement par M. Zopf, *qu'une seule et même espèce de bactérie peut se présenter sous des aspects très variés* par exemple comme spirille, leptothrix, bacille, bactérie et coccus, et nous obtînmes par là l'importante connaissance relative à l'histoire de ces plantes, que ces noms ne désignaient très souvent que des *formes de croissance de l'espèce*, et non des espèces distinctes. La question qui se pose est celle-ci : *quelles sont les conditions nécessaires pour qu'une espèce apparaisse sous l'une ou l'autre de ces formes déterminées?* Sur ce point, nous ne savons jusqu'à présent que très peu de chose (Voyez les bactéries de fermentation acétique).

Il y a en outre beaucoup de bactéries qui forment des *spores* de la manière suivante (Fig. 10, l, m): le plasma

dans la cellule devient plus foncé, souvent visiblement granuleux; puis apparaît un petit corps foncé, qui grandit rapidement et qui présente un pouvoir réfringent très prononcé. En même temps la plus grande partie du plasma cellulaire disparaît en servant à former la spore qui apparaît renfermée dans un liquide clair qui, à son tour, disparaît peu à peu; enfin la paroi cellulaire se resserre et finit par ne former plus qu'un appendice prêt à tomber de la spore mûre. Souvent on nomma cet organe *spore durable* et cela pour deux raisons: d'abord parce que la spore possède en effet bien plus de durabilité et une résistance bien plus grande contre des influences de l'extérieur que les fils végétatifs, et ensuite, parce que la formation des spores n'a généralement lieu que lorsque la matière nutritive de la végétation est épuisée ou qu'elle est devenue inefficace pour le développement végétatif ultérieur des organismes. La spore sert donc à conserver la vie pendant cette période critique.

Dès qu'il se présente des conditions favorables de nutrition et de température, la spore germe. Elle augmente d'abord de volume et son contenu perd de sa puissance réfringente. De la spore naît alors une bactérie et l'on voit quelquefois la paroi de la spore se déchirer ou se diviser en deux soupapes (Fig. 10, 13). Le fil, une fois développé, se multiplie de la manière ordinaire.

Parfois, on divise les bactéries en « *endospores* » et en « *arthrospores* »; les premières forment leurs spores à l'intérieur des fils végétatifs développés ultérieurement, tandis que d'après les études faites jusqu'à maintenant, les dernières n'ont pas encore montré une pareille sporulation intérieure; ici ce sont des membres détachés de cellules végétatives qui deviennent le point de départ de nouvelles générations végétatives (par exemple Bact. acéti). Par des recherches prolongées, on arrivera peut-être à trouver aussi chez les espèces de cette dernière catégo-

rie, des spores endogènes. Quant à prétendre que les membres mentionnés qui ont été séparés puissent être mis en parallèle avec les spores, ceci est une supposition encore insuffisamment fondée.

Pour terminer, nous devons encore mentionner un élément dans l'étude des formes des bactéries, la *formation des zooglées* (Fig. 10 *d*). Dans toutes les branches de l'industrie de la fermentation, il est connu que dans les endroits où le nettoyage n'est pas rigoureusement surveillé, il peut se former des amas gélatineux et graisseux, qui augmentent peu à peu d'épaisseur. La cause en est ordinairement un développement de bactéries où les cellules se groupent très près les unes aux autres, tandis que les couches gélatineuses extérieures enflent fortement. Pendant la multiplication ininterrompue des bactéries, la couche visqueuse augmente d'épaisseur et peut en même temps affecter certaines formes caractéristiques. Ces masses visqueuses — connues dans la sucrerie sous le nom de « gomme de sucrerie » ou « frai de grenouilles » — se présentent sur des corps solides aussi bien que dans des liquides.

Pasteur fit la découverte importante qu'il y a des bactéries et d'autres microorganismes qui n'ont pas besoin d'oxygène libre pour vivre et qui, privés de ce gaz, occasionnent une vigoureuse décomposition du liquide fermentatif. Au point de vue biologique il distingua, par conséquent, deux classes de microorganismes et nomma ceux dont nous venons de parler *anaérobies* et les autres *aérobies*. Plus tard M. Duclaux fit surtout remarquer qu'entre ces deux extrêmes, il existait des formes intermédiaires. Comme exemple de bactéries anaérobies, on peut citer la bactérie de la fermentation butyrique de Pasteur.

Nous donnons ici un aperçu des principales espèces qui jouissent d'une importance particulière dans l'industrie de la fermentation.

I. — Bactéries acétiques.

C'est Hansen qui nous donna le premier une description détaillée de la morphologie des bactéries acétiques. L'exactitude de ces recherches fut confirmée plus tard par MM. Zopf, de Bary et A. J. Brown.

Déjà, en 1838, Turpin et Kützing émirent l'opinion que la fermentation acétique était provoquée par un microorganisme et Kützing représenta cette bactérie et la décrivit sous le nom de *Ulvina aceti*. S'appuyant sur ces devanciers, Pasteur donna d'abord dans son Mémoire (1864) et surtout dans ses « Etudes sur le vinaigre » (1868), les preuves expérimentales de la justesse de cette opinion et il basa là-dessus un procédé pour la fabrication du vinaigre. Il supposa que la fermentation acétique était provoquée par une seule espèce qu'il nomma *Mycoderma aceti*. Des recherches ultérieures ont démontré qu'il existe plusieurs espèces de bactéries acétiques. *Il n'est donc encore nullement question, chez Pasteur, de l'emploi d'une espèce déterminée et choisie.* Son procédé consiste à donner une grande surface au liquide employé — deux parties de vin clair et une partie de vinaigre de vin — et de semer sur cette surface un jeune voile mycodermique. Quand la température, la composition du liquide et en général toutes les conditions sont favorables, l'acétification se fait de cette manière plus rapidement que par l'ancienne méthode d'Orléans. L'installation est, paraît-il, moins coûteuse et la perte d'alcool n'est guère plus forte que dans cette dernière méthode.

Le procédé Pasteur n'est cependant pas appliqué, autant que nous avons pu découvrir. La cause d'incertitude dans les résultats peut être cherchée en partie dans le fait que la composition du liquide nourricier varie, mais surtout dans le fait que *la culture des bactéries n'était pas une pure*, et qu'elle pouvait, par conséquent, contenir des espè-

ces de bactéries possédant des propriétés différentes, demandant des conditions vitales différentes et développant par conséquent des produits divers en quantités variables. Ceci se fera également sentir dans les cas où la végétation ne se compose que d'espèces qui, toutes, peuvent produire du vinaigre de vin. Déjà en 1879 Hansen a démontré que les formes du *Mycoderma aceti* cachaient au moins deux espèces distinctes, le *Bact. aceti* et le *Bact. Pasteurianum*.

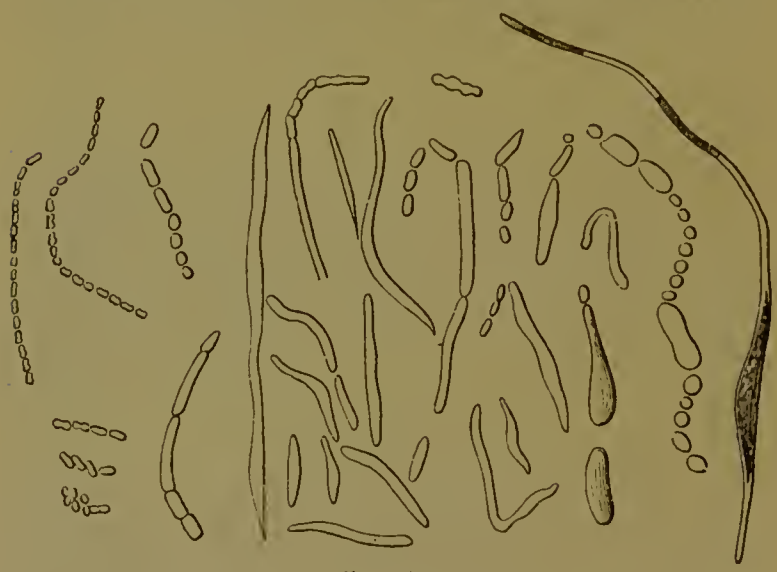

Fig. 11.

Bacterium aceti et Bact. Pasteurianum, d'après Hansen.

La culture absolument pure d'une espèce systématiquement choisie doit, dans cette industrie aussi, comme il nous l'a enseigné, former le point de départ. — L'ancienne méthode *d'Orléans* est encore toujours prédominante en France. D'après ce procédé, on verse le vin à acidifier dans des tonneaux sur lesquels l'air a largement accès. L'acétification se fait comme dans le procédé Pasteur, le liquide se couvrant également d'un voile mycodermique. Dans d'autres contrées on emploie ordinairement la méthode allemande dite «*vinaigrerie rapide*» où le liquide à acidifier,

exposé à un fort courant d'air, est réparti en gouttelettes sur de grandes surfaces (des copeaux de hêtre) afin de le faire entrer en contact intime avec l'air. Il n'a pas encore été fait de recherches sur les microorganismes qui agissent dans ce dernier procédé de fabrication.

Tandis que dans son ouvrage, Pasteur ne soutient pas formellement l'hypothèse que l'oxydation de l'alcool en acide acétique soit un processus de nature purement physiologique, M. Adolphe Mayer formula cette opinion, et Hansen fait ressortir comme certain que l'acétification est généralement provoquée par l'influence de bactéries. En outre, les recherches de Hansen font partie de celles qui, les premières, nous montrèrent qu'une fermentation déterminée pouvait être produite non-seulement par *une seule*, mais par plusieurs espèces de bactéries ; depuis cette époque, maints exemples ont été découverts.

Les diverses espèces de bactéries acétiques étudiées par Hansen se présentent sous les aspects les plus variés, qui se résument en trois formes principales : les *chaînettes*, les *longs filaments* et les *formes gonflées*. Un ensemencement dans de la bière double, un milieu nourricier très favorable, produit à 34° C une végétation aux *formes en chaînettes*. Un ensemencement de cette végétation donne à 40 1/2° C les *formes des filaments* : pour quelques espèces, ceux-ci peuvent atteindre une longueur de 200 micromillimètres et plus, tandis que les membres isolés ne mesurent que 2 ou 3 micromillimètres. Si l'on soumet encore une fois cette végétation de longs filaments à la température de 34° C, il en résulte de nouveau une transformation en forme de chaînettes. Le développement que prennent ces longs filaments à cette température les fait augmenter non-seulement en longueur, mais encore en *épaisseur*, et cela souvent même d'une manière considérable : c'est alors qu'apparaissent les *formes gonflées* très variées avec tous les états transitoires imaginables. Ce

n'est que plus tard que les filaments se divisent en petits articles, ce qui fait alors apparaître le type de la chaînette. Il n'y a que les parties les plus épaisses des chaînettes qui ne sont pas divisées et qui finissent par être résorbées. *Les renflements forment donc une phase régulière dans cette évolution cyclique.*

Hansen a donc donné ici, comme il l'a fait pour les *Saccharomyces*, un exemple de l'influence qu'exerce la température sur les formes d'évolution.

Au moyen de ses essais de coloration sur le *Bact. aceti*, Hansen découvrit, comme cela a été dit plus haut, que sous ce nom se cachaient au moins *deux espèces distinctes*, dont l'une — comme la plupart des autres bactéries — se colore en jaune par l'iode, tandis que l'autre en reçoit une teinte bleue. Pour la première, il conserve l'ancien nom *Bacterium aceti*, tandis qu'il nomme l'espèce colorée en bleu, d'après Pasteur, *Bacterium Pasteurianum*. Dans une conférence, il communiqua sur cette espèce les nouvelles observations suivantes : une belle coloration bleue par des solutions d'iode ou d'iodide de potassium s'observe sur les formations de voiles sur le moût ou la bière, ainsi que sur les végétations à la surface du moût gélatiné. Les végétations au contraire qui se développent sur l'eau de levure et sur la gélatine nutritive se colorent en jaune ; de vieux voiles sur de la bière offrent aussi la réaction jaune. C'est la matière gélatineuse partant de la paroi cellulaire qui se colore en bleu ; il n'a jusqu'à ce jour pas été possible de reconnaître si le contenu des cellules lui-même se colore ou non. Dans le moût gélatiné, le *Bact. Pasteurianum* développe des taches végétatives rondes avec un bord lisse ou ondulé, tandis que les taches correspondantes du *Bact. aceti* tendent à prendre des formes étoilées. Au point de vue morphologique, les deux espèces sont égales. On ne trouva pas de spores. La température

minimum pour le développement de *Bact. aceti* est de 4 à 5° C., pour le *Bact. Pasterianum* de 5 à 6° C; la température maximum pour les deux espèces est de 42 à 43° C.; la température optimum pour les deux espèces 34° C. Un fait d'un intérêt pratique, est que des cultures pures des deux bactéries acétiques dans la bière *n'exercent aucune influence sur la couleur ou la limpidité du liquide.* On peut, par là, s'assurer jusqu'à un certain degré si l'on a ces végétaux isolément ou non, attendu que dans la règle, les bactéries troublent le liquide. Pour pouvoir se développer vigoureusement, le *Bact. aceti* demande non-seulement beaucoup d'oxygène libre, mais encore une température assez élevée. Dans une cave bien installée (1-3° C.) on n'a donc aucune raison de craindre le *Bact. aceti*. Mais, dès que la bière quitte la cave et qu'elle est exposée à des températures plus élevées, le danger se présente toujours.

Plus tard, Hansen a décrit une troisième espèce sous le nom de *Bact. Kützingianum* dont les cellules dans les voiles sur de la bière double sont libres ou accouplées.

Dans le levain acide des boulangers, surtout quand il était vieux et qu'il était devenu très aigre, M. Peters trouva récemment une bactérie acétique, qui diffère du *Bact. aceti* et du *Bact. Pasteurianum*. Les colonies dans les cultures ordinaires sur plaques sont rondes et apparaissent, lorsqu'on les regarde par transparence, fortement colorées en brun, d'un aspect homogène; les colonies superficielles s'étendent suivant un plan. Les individus séparés ont 1,6 μ de longueur et 0,8 μ de largeur, sont obtus d'un côté et se terminent en pointe de l'autre; ils se présentent isolés ou reliés à deux, rarement à quatre. Cette bactérie ne manifeste aucune motilité. Dans de l'eau de levure avec 5 0/0 d'alcool, toute la masse se trouble d'abord, puis il se forme à la surface un voile mince, qui devient peu à peu vis-

queux. Peut-être que cette bactérie est la même que celle qui a été décrite par M. Duclaux.

Le *Bacillus ethaceticus* découvert par M. Percy Frankland fait fermenter énergiquement plusieurs substances, par exemple la mannite, en formant principalement de l'alcool éthylique et de l'acide acétique.

Pasteur a démontré que par l'oxydation d'un liquide alcoolique, l'alcool éthylique se transformait en acide acétique, et que par une oxydation prolongée, ce dernier se décomposait à son tour en acide carbonique et en eau. Ceci a été confirmé dans ces derniers temps par M. A.-J. Brown, auquel nous devons les recherches les plus complètes sur les fonctions chimiques des bactéries acétiques.

2. — Bactéries lactiques.

Si l'on expose du lait à une température de 35-42° C., il deviendra bientôt aigre, et une grande partie de l'acide qui se forme se trouvera être de l'acide lactique, produit par l'action de différentes espèces de bactéries. Quand il s'est formé une certaine quantité d'acide lactique, la fermentation cesse. Elle recommence lorsqu'on neutralise le liquide avec du carbonate de chaux, ou par l'addition d'une petite quantité de pepsine ou de pancréatine, qui ont pour effet de dissoudre la caséine du lait.

Un procédé souvent employé pour la mise en train d'une fermentation lactique spontanée est le suivant: on ajoute à un 1 litre d'eau, 100 grammes de sucre, 10 grammes de caséine ou de vieux fromage et une quantité abondante de carbonate de chaux pulvérisé. Ce mélange est versé dans un vase ouvert et exposé à une température de 35 à 40° C. On agite de temps à autre le liquide ou bien on y fait passer un courant d'air. La

fermentation achevée, on fait évaporer le liquide et il reste du lactate de chaux cristallisé, dont on extrait l'acide lactique en traitant à l'acide sulfurique.

Outre la lactose, quelques bactéries lactiques peuvent aussi faire fermenter le sucre de canne, la glucose, la maltose et diverses autres substances. D'après les expériences de M. Bourquelot, il y a une espèce de bactérie lactique qui se présente dans la fermentation acide spontanée du lait, pouvant faire fermenter le sucre de canne sans inversion préalable.

Dans des solutions de lactose ne contenant pas de caséine, M. Fokker ne put provoquer que de faibles fermentations lactiques, tandis que la quantité d'acide lactique augmentait par l'addition de caséine, et cela dans une proportion en rapport à la quantité présente de cette dernière substance.

Dans la brasserie, la fermentation lactique se manifeste déjà pendant le maltage, puis dans le moût et dans la fermentation secondaire; dans les bières belges, fabriquées par « fermentation spontanée » l'acide lactique se forme en grande quantité, ce qui donne aux bières un goût âcre. Dans les brasseries modernes, à fermentation basse, on cherche à tenir éloignées de la fermentation, tant les bactéries lactiques que toutes les bactéries en général. « Dans la distillerie », dit M. Maercker, « elles sont, provisoirement encore, à considérer comme un mal nécessaire. La production de l'acide lactique a lieu pendant la préparation de la levure, et son importance paraît se réduire à ce qu'elle prévient le développement de bactéries, et à ce qu'elle rend possible de cette manière la fermentation pure de la levure alcoolique. »

Le premier ouvrage important sur les ferments lactiques est dû à Pasteur (1858), qui décrivit l'espèce de bactérie lactique qui se produit lorsque le lait entre spontanément en fermentation. Dans ses « Études sur la

bière » il a donné un dessin des bactéries qui se développent dans le moût et la bière entrés en fermentation lactique (Fig. 12) ; il les décrit comme de petits bâtonnets légèrement étranglés au milieu, généralement isolés et ne formant que rarement des chaînes.

Plus tard, M. Hueppe trouva dans une fermentation lactique spontanée une bactérie qui convertit la lactose et d'autres saccharates en acide lactique avec formation simultanée d'acide carbonique. Elle consiste en cellules courtes, épaisses, immobiles, qui sont au moins la moitié plus longues que larges et qui sont accolées deux à deux, et plus rarement quatre à quatre. Dans des solutions sucrées et moins clairement dans le lait, elles forment des spores qui apparaissent en globules brillants aux extrémités des bacilles. Dans les plaques de gélatine, elles forment des colonies blanchâtres qui, tant qu'elles se trouvent à l'intérieur de la masse, sont rondes, uniformément foncées, aux contours nettement dessinés ; lorsqu'elles se trouvent à la surface, elles ont une bordure plus claire. Pour la fermentation au moyen de cette espèce, l'oxygène de l'air est de rigueur. Elle fait coaguler la caséine du lait.

Fig. 12.

Bactéries lactiques d'après Pasteur. Pour donner une idée de la grosseur des bactéries, quelques cellules de levûre ont été dessinées dans la figure.

Dans la littérature moderne, on trouve la description d'un grand nombre de bactéries lactiques. On en trouva par exemple deux espèces (microcoques) dans la salive et dans le mucus des dents. Parmi les espèces formant le pigment, il s'en trouve aussi qui, en dehors de leur fermentation pigmentaire, sont capables de produire de la lactose assez d'acide lactique pour faire coaguler la caséine du lait. Ici se rangent en outre, d'après

M. Hueppe, le célèbre *Micrococcus prodigiosus*, et d'après M. Krause une forme pathogénique, le micrococcus de l'ostéomyélite, qui appartiennent à ces espèces.

D'après les indications de M. Delbrück, M. Zopf obtint une bactérie lactique en exposant pendant quelque temps un mélange de 200 grammes de malt et de 1000 grammes d'eau à la température de 50° C. On ensemençait par ce liquide une solution de lactose, à la surface de laquelle le champignon formait bientôt un voile. Les filaments se composent d'abord de bâtonnets; plus tard, on peut observer à ces mêmes filaments des bâtonnets et des coques.

Dans le levain acide de boulangerie, M. Peters trouva une bactérie qui provoqua une fermentation lactique prononcée. Dans les cultures sur plaques, elle forme des colonies rondes à couches concentriques. Les bâtonnets montrent une mobilité vive comme dans un essaim. Sur une solution sucrée neutre d'eau de levure, cette espèce forme, au bout de quelque temps, à 30° C., un voile visqueux; ici les bâtonnets se sont prolongés en longs filaments. On n'observa pas une formation de spores.

Le *Pediococcus acidi lactici* analysé par M. Lindner donne, lorsqu'il est cultivé à 41° C. dans une solution neutre d'extrait de malt, une réaction fortement acide; dans une solution non stérilisée, de ladite espèce, ainsi que dans une décoction de foin non stérilisée, cette bactérie se développe à la température indiquée, d'après M. Lindner, tellement vigoureusement, que tous les autres organismes sont arrêtés dans leur reproduction. Par voie chimique, on constata que la majeure partie de l'acide qui s'était formé en abondance était de l'acide lactique. Quand une infusion de malt d'orge ou de malt de seigle est tenue à 41° C. le *Pediococcus* se développe fortement, et les bâtonnets lactiques se retirent. Dans une solution neutre d'extrait de malt, le *Pediococcus*

soumis à 62° C. est tué en cinq minutes. Sur des gélatines, il ne se développe que difficilement ; ce n'est qu'en culture par piqûre dans de l'extrait de malt gélatiné qu'il forme à l'intérieur de la masse de très vigoureuses colonies de couleur blanche. Il paraît, du reste, mieux croître à l'abri de l'air que sous son influence.

Le *Saccharobacillus Pastorianus* décrit par M. van Laer qui apparaît sous forme de filaments de différentes longueurs, cause dans la bière une maladie particulière (bière tournée), laquelle se manifeste de la façon suivante : le liquide perd peu à peu son éclat ; si on l'agite, les filaments soyeux se détachent du fond et en même temps la bière acquiert une odeur et un goût désagréables. Dans les cultures, le bacille se développe aussi bien en présence de l'oxygène libre qu'en son absence. Dans les milieux nutritifs, il fermente les hydrates de carbone. La saccharose est fermentée sans interversion préalable. Les produits de la fermentation sont, entre autres, l'acide lactique, l'acide acétique et l'alcool. Les acides formés déterminent dans la liqueur un précipité de matières azotées qui, mélangées au bacille, forment ces nuages composés de filaments soyeux, dont nous avons parlé.

Outre les auteurs mentionnés, il y en a encore plusieurs qui se sont occupés de l'étude des bactéries lactiques, ainsi M. Duclaux, le collaborateur de Pasteur. Récemment M. Grotenfelt décrivit des espèces qui doivent bien être considérées comme nouvelles ; il ne réussit cependant pas à les identifier avec celles qui furent décrites par MM. Hueppe et Marpmann. Chez quelques-unes, on observa qu'elles décomposaient le sucre en alcool, à côté de l'acide lactique qui se dégage. Il suppose qu'elles participent à la formation de l'arome dans le beurre.

Dans ces derniers temps, on a introduit, en divers endroits, dans la pratique des cultures pures méthodiquement choisies de certaines bactéries lactiques, d'après les

mêmes principes que Hansen a suivis pour les levures alcooliques dans la brasserie, en vue d'amener une acidification plus rationnelle de la crème servant à faire le beurre. MM. Weigmann, Storch et Qvist ont isolé une série de bactéries lactiques qui, employées à l'acidification de la crème du beurre, lui ont donné un goût acide plus ou moins pur, et également un arome plus ou moins prononcé, de même que la propriété de pouvoir se conserver des beurres était différente selon les différentes espèces utilisées.

M. Storch appuie surtout sur une espèce qui, dans des essais d'acidification avec de la crème à l'usage des métairies, donna à celle-ci non-seulement un goût pur et agréablement aigrelet, mais qui lui donna encore, ainsi qu'au beurre qui se formait, un arome pur et bien marqué, Elle forme dans la gélatine de très petites colonies de belle couleur blanche, à bords unis. Dans le lait et le petit-lait, elle se présente en bactéries épaisses, ovales ou globulaires, formant des chaînes mobiles. Elle a de la ressemblance avec le « ferment lactique » de Pasteur. A 28° C. elle présente une vigoureuse activité fermentative.

Une espèce qui fut employée pratiquement dans plusieurs endroits avec encore plus de succès, a été obtenue par M. Qvist. Celle-ci se présente comme microcoque ou sous d'autres formes, selon les divers milieux dans lesquels elle est cultivée. Sur la gélatine, elle forme de petites colonies toutes rondes, croissant lentement, de couleur jaune pâle. Dans les cultures par piqûre, il naît une série de colonies globulaires, et dans les cultures par stries elle forme une ligne continue avec des bords ondulés. Elle fut isolée d'un échantillon de beurre, qui possédait à un degré tout particulier de l'arome et la faculté de se conserver.

D'autre part, on trouva dans les dernières années une série d'espèces de bactéries qui provoquent des maladies

dans le lait. Ainsi M. Schmidt-Mülheim trouva un microcoque qui se présente en chaînes formant des chapelets et qui rend le lait visqueux. Une espèce possédant la même propriété et qui provoque en même temps une vigoureuse fermentation lactique fut trouvée par M. Ratz. D'autres de ces espèces visqueuses ont été décrites par MM. Adametz, Duclaux, Guillebeau et Löffier. M. Weigmann prépara une culture pure d'une certaine espèce qui donne au lait un goût amer et qui sécrète un ferment dissolvant, la caséine. M. Jensen trouva également une espèce qui provoque dans le lait et le beurre des changements de goût très anormaux; celle-ci se présenta en bâtonnets épais, mobiles, de différentes longueurs, tenant en partie du microcoque. M. Storch a prouvé que le repoussant goût de suif du beurre provenait d'une forme de bactérie acidifiant et coagulant le lait.

3. — Bactéries butyriques.

Lorsque l'on a laissé reposer du lait pendant quelque temps et qu'il a montré un développement de bactéries lactiques, et que l'on a en même temps neutralisé l'acide en additionnant de la chaux (craie), de manière à former du lactate de chaux, il se produit généralement une fermentation butyrique provoquée par plusieurs espèces de bactéries butyriques. Cette fermentation butyrique spontanée a sa plus grande activité entre 35-40° C. L'amidon, la dextrine, le sucre de canne et la dextrose fournissent un milieu pour des fermentations butyriques, et celles-ci se produisent très facilement parce que les différentes bactéries de ce groupe sont très répandues dans la nature. Ce sont sans doute aussi des espèces semblables qui jouent un rôle dans la maturation du fromage et qui participent à donner aux diverses qualités, leur goût et arome particulier. Pour produire une fermentation butyrique, Fitz re-

commande de mélanger 2 litres d'eau avec 100 grammes de fécule de pommes de terre ou de dextrine, 1 gramme de sel ammoniac et les sels nutritifs ordinaires ; le tout avec 50 grammes de craie, et de maintenir ce mélange à 40° C. M. Bourquelot recommande d'exposer de l'eau et des tranches de pommes de terre crues pendant quelques jours à 25-30° C.

Les principaux produits de la fermentation butyrique sont l'acide butyrique, l'acide carbonique et l'hydrogène.

Dans la trempe sucrée des brasseries, distilleries et fabriques de levure pressée, il se présente toujours des espèces de bactéries butyriques qui peuvent, si les trempes sont maintenues pendant longtemps à de certaines températures, se développer fortement et exercer une action nuisible sur les ferments alcooliques. Lorsqu'il se trouve dans la bière de l'acide butyrique en quantité sensible, elle prend un goût très désagréable.

D'après les recherches de Pasteur, le ferment butyrique peut exercer son action fermentative sans oxygène libre. Les fermentations butyriques spontanées ordinaires sont le plus actives lorsque l'oxygène n'a pas accès. Des recherches ultérieures ont cependant démontré qu'il existait beaucoup de bactéries butyriques qui, non-seulement donnent des produits de fermentation différents, mais qui se comportent aussi différemment à l'égard de l'oxygène libre. Quelques-unes ne peuvent pas se développer tant que ce dernier est là — espèces anaérobies — tandis que d'autres, au contraire, se multiplient et provoquent des fermentations butyriques lorsqu'on donne accès à l'oxygène — espèces aérobies.

Une des premières espèces décrites d'une manière exacte est le *Clostridium butyricum (Bacillus butyricus)* de Prazmowski (Fig. 13). Elle se présente sous la forme de filaments et bâtonnets courts et longs, qui peuvent être droits ou légèrement recourbés. Avant la formation des

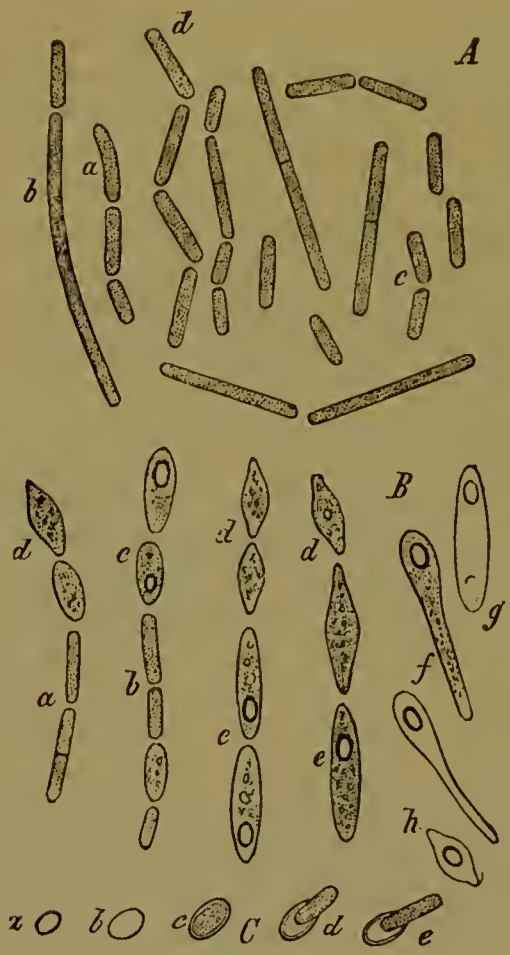

Fig. 13.

Clostridium butyricum Prazmowski, d'après Prazmowski. **A** États végétatifs, **c** bâtonnets courts, **d** bâtonnets longs, **a** et **b** bâtonnets et filaments recourbés à l'instar des vibrions. **B** Formation des spores durables; **b, d** bâtonnets avant, **c, e** pendant, **f, g, h** après la formation des spores durables: **c** bâtonnets à forme ellipsoïdale, **d** et **h** forme de citron, **e** et **g** forme de fuseau, **f** forme de têtard. **a** bâtonnets se trouvant encore à l'état végétatif. **C** Germination des spores durables; la spore **a** se gonfle en **b**, **c** montre alors la différenciation de la membrane en exo = et endospore. Par l'extrémité polaire fendue de la spore, le contenu entouré de l'endospore se dégage sous la forme d'un bâtonnet court **d**, qui s'est déjà allongé en **e**.

spores dans les bâtonnets, ceux-ci se gonflent et prennent, comme le montre la figure, des formes particulières ayant l'apparence d'un fuseau, d'un citron, d'un ellipsoïde ou d'une massue. En même temps les bâtonnets offrent la propriété remarquable de se colorer en bleu par l'iode. Pendant la germination de la spore, son enveloppe extérieure se fend et le fil germinatif croît dans la même direction de l'axe longitudinal de la spore. Le *Clostridium butyricum se développe le plus vigoureusement à une température d'environ 40°* C., et il pourra prédominer dans des liquides sucrés surtout quand le ferment lactique aura déjà antérieurement con-

verti une partie du sucre en acide lactique. Cette espèce est éminemment anaérobie.

M. Fitz a fait la description d'une espèce appartenant aux formes aérobies. C'est un court bacille cylindrique, que l'iode ne colore pas en bleu, qui manifeste un mouvement spontané modéré et qui ne forme pas de spores. Il fait fermenter tous les hydrates de carbone, excepté la fécule et la cellulose.

M. Hueppe aussi a décrit une espèce qui fut trouvée dans le lait et qui offre les mêmes propriétés que celle de Prazmowsky, mais qui s'est montrée moins sensible envers l'oxygène et qui doit, par conséquent, être rangée parmi les espèces aérobies. M. Gruber trouva associées sous le nom de *Clostridium butyricum*, trois espèces bien distinctes, dont deux exclusivement anaérobies. La première de ces deux espèces développe des bâtonnets droits ou légèrement recourbés qui, durant la sporulation, prennent des formes de fuseau ou de baril; elles forment sur de la gélatine nutritive des colonies qui, lorsqu'on les regarde par transparence, paraissent brun foncé ou même noir. La seconde espèce se compose de bâtonnets végétatifs fortement recourbés, portant les spores à leur extrémité; elles développent des colonies variant du jaunâtre au jaune-brun. La troisième espèce est, il est vrai, aussi capable de croître et de provoquer la fermentation, même à l'abri de l'oxygène; mais son développement se trouve sans contredit favorisé par la présence de l'oxygène, et ce n'est qu'alors qu'elle est à même de produire des spores. Les bâtonnets végétatifs sont cylindriques; avec la formation des spores, ils prennent la forme d'un fuseau au centre duquel se développe la grande spore. Les colonies sur de la gélatine nutritive sont de couleur jaunâtre. Toutes ces trois espèces décomposent les hydrates de carbone en acide butyrique et en alcool butylique.

D'après Fitz, les spores des bactéries butyriques peuvent supporter la température d'ébullition pendant un espace de temps qui dépend, ici comme ailleurs, de l'état dans lequel elles se trouvent et de la nature du milieu nourricier. M. Fitz fixe 3-20 minutes comme limites. Ces spores peuvent cependant aussi être détruites à une température moins élevée si l'on a soin d'entretenir celle-ci suffisamment longtemps. Ainsi, elles sont tuées quand on les chauffe pendant six heures à 90° dans une solution de glucose; dans de la glycérine, à la même température, seulement au bout de 6 à 11 heures.

La fermentation butyrique, comme la fermentation lactique, n'est donc pas provoquée exclusivement par *une seule* espèce. Quand la fermentation butyrique se produit dans des distilleries, brasseries ou fabriques de levure pressée, on sera souvent en présence de bactéries différant complètement de celles qui ont été décrites plus haut.

Le *Clostridium butyricum* et plusieurs autres espèces sont capables de dissoudre la cellulose, et jouent par cela un rôle important dans la *fermentation de la cellulose* que l'on utilise dans diverses branches de l'industrie.

4. — Organismes du Képhir.

Le *képhir*, sur lequel Kern nous a renseigné, désigne un lait mousseux, alcoolique, acide, que les habitants du Caucase préparent avec du lait de vache, de chèvre ou de brebis. On le fait en ajoutant au lait un ferment particulier, les grains de képhir. Ce sont des grains inégaux, blancs ou jaunâtres, de forme irrégulière, atteignant la grosseur d'une noix, de consistance tenace et gélatineuse et qui, en séchant, deviennent cartilagineux et cassants. La majeure partie de la masse de ces grains consiste en bactéries en bâtonnets, qui sont reliées pour

former des filaments après avoir développé des membranes visqueuses. M. Kern nomme cette bactérie *Dispora caucasica*. Les grains de képhir contiennent en outre des champignons semblables aux levures, parmi lesquels plusieurs espèces de véritables *Saccharomyces*. La préparation du képhir consiste à verser un peu de lait sur les grains, qu'on laisse ensuite reposer pendant 24 heures, après quoi on transvase le lait en conservant les grains, qui resservent plus tard. Ce lait se mélange alors avec du lait frais ; on le met en bouteilles que l'on bouche, ou dans des sacs en cuir bien fermés et au bout de quelques jours il s'est développé une fermentation. Il contient à ce moment jusqu'à 2 pour cent d'alcool. Ce résultat est sans doute dû à l'action simultanée de la *Dispora caucasica* mentionnée plus haut et des levures combinées aux bactéries lactiques, qui probablement se trouvent toujours dans le lait. Ces dernières convertissent une partie de la lactose en acide lactique : l'alcool et une partie de l'acide carbonique proviennent évidemment des levures. Comme le lait fermenté contient bien moins de caséine coagulée que le lait caillé ordinaire, on peut de plus admettre que la *Dispora* est aussi à même de liquéfier (peptoniser) en partie la caséine coagulée, peut-être précisément à l'aide de cette masse gélatineuse qu'elle sécrète et qui se trouve dans les grains de képhir, tandis qu'elle ne se présente pas dans le lait fermentant. — Si l'on laisse un de ces grains de képhir dans du lait, il croît très lentement et n'atteint, d'après les expériences de M. de Bary, que dans l'espace de quelques semaines le double de sa grosseur primitive. Cet auteur considère comme probable que dans ces conditions, quelques articles de la *Dispora* se séparent et donnent naissance à de nouveaux grains de képhir. Suivant le procédé indiqué par M. A. Lévy, le képhir peut être obtenu sans l'addition du ferment décrit par

M. Kern. En agitant fortement et souvent du lait qui se caille, on obtient une boisson de képhir mousseuse, alcoolique, dont le goût ne diffère pas sensiblement de celui préparé avec les grains. D'après les indications de M. de Bary, le képhir obtenu par agitation contenait environ 1 0/0, un échantillon de képhir de grains 0,4 0/0 d'alcool en volume (Schmiedeberg). Les recherches les plus récentes de MM. Duclaux, Grotenfelt, Adametz, etc., ont démontré qu'il y avait aussi des levures aptes à faire fermenter la lactose sans l'aide de bactéries. (Voir chapitre V).

Le *ferment de la bière de gingembre*, qui a quelque ressemblance morphologique avec le ferment du képhir, a été étudié, tant au point de vue botanique qu'au point de vue biologique, par M. Marshall-Ward. Lorsqu'on introduit ce ferment dans des solutions sucrées, additionnées de gingembre, on les transforme par là en une boisson acide, mousseuse : la bière de gingembre. A l'état frais, ce ferment se présente en masses solides, blanches, translucides, irrégulières, grumeleuses, cassantes comme de la gelée sèche, variant de la grosseur d'une tête d'épingle à celle d'une grosse prune. Elle provoque dans la solution sucrée une fermentation alcoolique et rend en même temps le liquide visqueux. M. Marshall-Ward isola les nombreux microorganismes se trouvant dans les corps décrits plus haut et donna des descriptions exactes d'une série de levures, de bactéries et de moisissures, parmi lesquelles se trouvèrent deux microorganismes, qui provoquaient principalement la fermentation de la bière de gingembre. L'un est un *Saccharomyces* appartenant au groupe des ellipsoïdes et provenant probablement du gingembre et du sucre brun employés dans la pratique. L'auteur lui a donné le nom de *Saccharomyces pyriformis*. Cette espèce intervertit le sucre de canne,

provoque une fermentation alcoolique active dans les solutions de sucre de canne interverti et forme dans les bouteilles un dépôt blanc et pâteux. Le champignon développe au bout de 40 à 50 heures, à 25°, des spores sur des blocs de plâtre ; il forme aussi des spores sur de la gélatine. Dans du moût houblonné, il provoque une fermentation médiocrement énergique et couvre la surface d'un voile ; les cellules de ce voile ont ordinairement la forme d'une poire ou d'un bourrelet allongé.

L'autre forme qui est toujours représentée et qui est essentiellement active dans la fermentation, est un schizomycète, le *Bacterium vermiforme* qui, d'après la supposition de l'auteur, provient du gingembre. Ce champignon est un microorganisme ayant la forme bizarre d'un ver enfermé dans des gaînes hyalines, gonflées, gélatineuses. Celles-ci contiennent les cellules de levure dans les masses parenchymateuses formées par les contours. Les gaînes gonflées de cet organisme forment la masse principale du ferment. Cette espèce se présente également sans les gaînes et avec toutes les différentes formes de végétations qu'on rencontre chez les bactéries. Les gaînes gélatineuses ne sont formées que lorsque le liquide ne contient pas d'oxygène et lorsqu'il est acide.

D'autres organismes étaient toujours représentés par une espèce de *Mycoderma* et par le *Bacterium aceti*. On trouva aussi mélangé accidentellement un grand nombre de différentes bactéries et d'autres champignons.

La preuve que le *Saccharomyces pyriformis* et le *Bacterium vermiforme* étaient les deux seules espèces essentiellement actives dans la fermentation du gingembre, a été donnée par l'auteur au moyen d'expériences. Car ce n'est qu'en provoquant une fermentation avec ces deux espèces, qu'il put produire une action analogue à celle due à l'emploi du ferment ordinaire de la bière de gingembre. Mais ce n'est que lorsque ces deux espèces se

développent simultanément dans le liquide, qu'elles produisent ce résultat, et les expériences de l'auteur démontrent que les rapports entre la levure et la bactérie sont ceux d'une véritable vie en commun (*symbiose*), de sorte que les deux espèces forment un organisme composé comme un lichen, qui produit une « fermentation symbiotique ».

5. — Bactéries visqueuses.

Parmi les différentes bactéries visqueuses, plusieurs espèces ont pour l'industrie de la fermentation un intérêt particulier, car elles se trouvent dans le vin et le moût en fermentation et produisent des altérations morbides dans ces liquides. Selon toute analogie, cette viscosité peut être considérée comme un phénomène étroitement lié à la formation des zooglées (voir page 66), qui est générale chez les bactéries. Chez quelques espèces, on considère cependant la matière visqueuse comme un produit de la décomposition du sucre, c'est-à-dire comme ne faisant pas directement partie de l'organisme en question.

Dans les fermentations visqueuses étudiées par M. Béchamp, il se forme une espèce de dextrine, que cet auteur nomma *viscose*, ainsi que de l'acide carbonique et souvent en même temps de la mannite.

Dans ses « *Études sur la bière* », Pasteur décrit (Planche I, Fig. 4) des chapelets d'organismes sphériques qui rendent le vin, la bière et le moût filants.

Dans de la bière blanche de Berlin devenue « filante », M. Lindner trouva un *Pediococcus* dans un fort développement. La maladie put être provoquée par l'infection du moût stérilisé de bière blanche avec des cultures pures de cette espèce. Par contre, cet organisme resta sans influence sur du moût houblonné ou sur des bières de fermentation basse.

Dans des bières *filantes* belges, M. van Laer trouva comme promoteurs de ladite maladie de petits bâtonnets très minces, ayant 1,6 à 2,4 μ de longueur, isolés ou accolés deux à deux par une substance zoogléiforme intermédiaire. Inoculés dans du moût de bière, ces bâtonnets le troublaient d'abord, puis le rendaient filant. Sur du bouillon gélatinisé, ils produisent des colonies en anneaux concentriques de différentes couleurs avec un renfoncement au milieu : par des inoculations en stries, on obtient de larges bandes blanches à bords sinueux ; par des cultures par des piqûres, il se forme des traînées blanches qui s'étendent rapidement vers le fond du tube ; la gélatine se fend et la colonie envahit les cavités ainsi produites, en même temps qu'elle forme une tache très développée à la surface autour de la piqûre. Il est résulté des expériences faites avec des cultures pures de cette forme de bactérie dans du moût de bière, que sous cette même forme se trouvaient réunies plusieurs espèces produisant chacune un effet un peu différent sur le moût. Elles sont désignées collectivement sous le nom de *Bacillus viscosus*. Quand on infecte un moût stérilisé par cette bactérie et qu'on ajoute quelques heures après de la levure alcoolique, le liquide devient visqueux. Lorsque le moût est ensemencé avec un mélange de levure absolument pure et de bactéries, la maladie se déclare à différents degrés, suivant la quantité de bactéries mêlées à la levure. Si les bactéries ne sont ajoutées qu'après la fin de la fermentation principale, la maladie ne se montre pas. Plus le liquide est riche en matières *azotées*, plus la viscosité se produit rapidement. Même des liquides ne contenant pas de sucre peuvent être rendus filants par ces espèces. Par contre, ce phénomène ne se manifeste pas dans des solutions uniquement sucrées.

La *bactérie de la gomme de sucrerie*, « *frai de grenouilles* » (*Leuconostoc mesenterioïdes*) (Fig. 14), a été étudiée

par Cienkowski et van Tieghem et plus tard par MM. Zopf

Fig. 14.

Leuconostoc mesenterioïdes Cienkowski, d'après Zopf.

A Couples de cellules de la variété sans enveloppe, prise d'une culture sur pommes de terre.

B Phases de développement provenant d'une culture sur gélatine non sucrée : **Ba** sans enveloppe gélatineuse ; **Bb** la même après 24 heures de culture dans une solution de mélasse ; les enveloppes gélatineuses existent déjà, mais elles ne sont pas encore fortement développées ; **Bc** au bout de 48 heures de culture dans de la mélasse, les enveloppes sont plus développées, en partie emboîtées l'une dans l'autre.

C Un petit grumeau gélatineux, d'où les petites cellules sont sorties.

et Liesenberg. La forme répandue en Europe aussi bien que la variété trouvée par M. Winter, à Java, se dévelop-

pent spontanément dans le jus de betteraves et dans la mélasse des sucreries, où elles forment de gros grumeaux visqueux (gomme de sucrerie). Ces organismes se multiplient fortement et ils forment des chaînes de coques accouplés deux à deux. Contrairement à des observations antérieures, M. Zopf trouva qu'il n'existe aucune différence, tant au point de vue morphologique qu'au point de vue physiologique, entre ces coques. Une sporulation ne peut en général pas du tout se constater. Ainsi l'analogie établie précédemment entre ce champignon et le genre d'algues *Nostoc* (indiquée dans le nom *Leuconostoc*) est supprimée.

Dans de certaines conditions, les cellules sont revêtues d'une enveloppe gélatineuse très forte, composée d'un hydrate de carbone gommeux, nommé *dextrane*. Cette formation, qui est un produit d'assimilation, n'a lieu qu'en présence de glucose, et non pas dans des solutions de lactose, de maltose, de dextrine, attendu que ces hydrates de carbone, ainsi que la glycérine, ne sont pas assimilables. Suivant les conditions de culture, par exemple sur des pommes de terre, cette espèce se développe sous une toute autre forme, à laquelle l'enveloppe gélatineuse fait complètement défaut.

Le *Leuconostoc* fait fermenter la glucose, le sucre de canne (après inversion préalable), la lactose, la maltose et la dextrine avec production de gaz et d'acide. Le champignon produit un ferment intervertissant le sucre de canne: d'autres ferments ne purent être découverts.

Ce qu'il y a surtout de caractéristique, c'est la force de résistance de ce champignon, même aux températures élevées; et en second lieu, c'est que les *jeunes* cultures supportent des chaleurs plus fortes que les anciennes. Très remarquable est aussi l'effet favorable qu'exercent de grandes quantités de chlorure de calcium sur la croissance et l'action fermentative de ce champignon.

6. — Bactéries à action intervertissante, diastatique et peptonisante.

La formation de ferments chimiquement solubles est très répandue dans le monde des bactéries. On reconnaît là-dedans un de ces moyens par lesquels ces êtres vivants peuvent déployer une activité si grandiose dans l'économie de la nature.

D'après les communications de Hansen, il y a aussi parmi les *bactéries* qui se présentent généralement dans la *bière*, plusieurs espèces qui sécrètent des *ferments intervertissants*. Parmi ces espèces, se trouve à son tour un groupe ayant une action intervertissante sur une solution pure de saccharose, qui cesse dès que l'on ajoute une décoction de levure. Des faits analogues furent observés par Wortmann chez les bactéries qui développent des *ferments diastatiques*. Il les trouva sur des haricots ou sur des pommes de terre en putréfaction et fit les cultures dans des mélanges de sels nutritifs et de fécule de blé. Marcano trouva aussi une espèce à action diastatique qui se présente souvent dans l'enveloppe extérieure des grains de maïs. Dans le levain acide de boulangerie, Peters trouva un bacille dissolvant l'amidon. Celui-ci produit, dans des cultures ordinaires sur plaques de gélatine, des colonies à échancrures caractéristiques composées de longs filaments, d'environ 0,5 μ d'épaisseur. Dans les jeunes colonies, ceux-ci sont plus courts et mobiles. Dans du moût de bière, le bacille forme des bâtonnets d'une mobilité extrême, qui produisent peu à peu un voile à la surface. Les spores ont la forme de bâtonnets, et leur contenu très réfringent est surtout amassé aux pôles.

Fermi examina une longue série de bactéries sécrétant un ferment diastatique.

Un bacille possédant une *puissance peptonisante* fut trouvé par M. Peters parmi les organismes du levain acide de boulangerie. Les spores donnent naissance à des bâtonnets se développant sous la forme de longs filaments, qui se divisent à leur tour de nouveau en bâtonnets. Dans de la gélatine nutritive ordinaire, cette espèce ne croît pas, ou si elle croît, ce n'est que très difficilement ; mais par contre elle vient facilement et même vigoureusement, quand on ajoute de « l'amidon soluble ». La gélatine se liquéfie rapidement. Les spores se produisent en grande quantité dans des cultures faites dans de l'eau de levure neutralisée. L'observation des gouttes tournées en bas dans une chambre humide montra que des petits morceaux de blanc d'œuf de poule cuit sont fortement attaqués ou même complètement dissous par cette espèce.

7. — Formes de Sarcina.

Outre le *Pediococcus acidi lactici* mentionné plus haut, on trouve encore dans des liquides en fermentation un grand nombre d'espèces de bactéries globulaires, dont les conditions vitales ne sont que très imparfaitement connues. Dans la fermentation basse, comme dans la fermentation haute (surtout dans les distilleries et fabriques de levure pressée), on rencontre des *microcoques* dont l'action nuisible sur les liquides fermentés ou sur la levure, a été assidûment signalée dans les divers journaux techniques se rapportant à ces industries. Des expériences directes n'ont cependant réellement démontré l'existence de cette action que dans un seul cas tout à fait isolé (voir « Bactéries visqueuses »). Dans la bière de garde de fermentation basse, ces formes se présentent comme des corpuscules plus ou moins sphériques d'un gris d'eau, tantôt isolés, tantôt par groupes, le plus sou-

vent réunis par quatre; ils ont été décrits par Hansen sous le nom de *Sarcina* (Fig. 15). On rencontre des organismes du genre de *Sarcina* dans des endroits très différents de la nature. Les véritables foyers de développement propres aux diverses espèces ne sont cependant pas encore connus.

M. Reinke observa souvent ces formes dans la bière de fermentation basse comme dans celle de fermentation haute. Il trouva que dans ces cas, la bière de garde contaminée formait rapidement des dépôts considérables et prenait un goût et une odeur désagréables. La bière blanche prenait souvent une couleur rouge et contenait alors une grande quantité de *Sarcinas*, et une température un peu plus élevée en faisait, en peu de jours, considérablement augmenter le développement. D'après M. Reinke, des températures de 10 à 14° paraissent être ici particulièrement favorables. Cependant il fait remarquer, avec raison, que l'on ne sait pas si c'est la *Sarcina* ou les bâtonnets toujours présents qui sont la cause véritable de la maladie mentionnée précédemment, — on sait seulement que dans la bière rouge la *Sarcina* caractérise des conditions anormales; mais des recherches exactes doivent encore déterminer si elle en est la cause ou l'effet.

Fig. 15. *Sarcina*.

Dans les résidus frais de distillerie que l'on utilise comme fourrage, M. Braeutigam trouva un microcoque de la nature des *Sarcinas*, qui possédait des propriétés pathogéniques. On n'a pas encore établi par des expériences directes, si ce dernier avait des rapports avec la maladie du peigne qui se présente chez les animaux domestiques.

M. Lindner étudia une série de ces organismes appelés *Sarcina* et nous donna de précieux renseignements relativement à la connaissance des conditions vitales

de ces formes. Le « *Pediococcus cerevisiæ* » paraît dans les cultures comme coque, diplocoque ou tétrade. Des cultures dans du bouillon nutritif gélatinisé, recouvertes en partie de feuilles de plâtre, montrèrent que la présence de l'air activait la croissance des colonies de cette bactérie. Dans les premiers jours, toutes les colonies étaient incolores ; plus tard elles montrèrent le commencement d'une coloration jaunâtre ou jaune-brun. La gélatine n'était pas liquéfiée. Cultivé par inoculation en strie sur de la gélatine nutritive, cet organisme donna une bande à bordures assez unies, gris-blanc, humide, irisant vivement en fines couches ; ensemensé par piqûre, il se développa tout le long de la ligne d'inoculation et forma à la surface de la gélatine un point blanchâtre, qui se déploya en forme de feuille. Sur des tranches de pommes de terre cuites, cette espèce ne croît que difficilement et présente, lorsque de telles cultures sont devenues vieilles, des formes bizarres d'involution. Dans de l'infusé de viande gélatinisé, l'organisme fut tué dans l'espace de huit minutes à 60° C; par contre, il ne le fut pas même au bout de 12 minutes entre 50-55° C. Dans du moût houblonné, il forme un dépôt et plus tard un voile. Après l'action du *Pediococcus*, l'acidification du liquide est très faible et l'auteur présume qu'il se forme des traces d'acide lactique. M. Lindner déclare que dans aucun cas il n'a réussi à provoquer une maladie proprement dite dans du moût ou de la bière, en infectant ces liquides avec une végétation vigoureuse de cette bactérie ; aussi observe-t-il que ce n'était peut-être pas du tout cette espèce qui occasionnait une altération du goût de la bière, mais plutôt d'autres bactéries que l'on rencontre en même temps dans la bière contaminée. Par contre, il prétend que le *Pediococcus* trouble la bière. Nous avons parlé plus haut de l'espèce visqueuse décrite par M. Lindner.

M. A. Petersen a observé qu'un riche développement d'une *Sarcina* pouvait se produire dans de la bière de fermentation basse sans qu'aucune maladie ne se manifestât : la bière était au contraire limpide, elle se conservait bien et avait un arome et un goût fins. Il existe donc des espèces de *Sarcina* ne provoquant pas de troubles dans la fabrication.

Toute cette question n'a d'ailleurs pas encore été étudiée bien amplement.

8. — Crenothrix.

Dans les études microscopiques de l'eau, on rencontre très souvent les formes bien prononcées du *Crenothrix Kühniana* ou peste des puits (Fig. 16).

Cette bactérie se présente dans toute eau contenant des substances organiques (où elle est souvent accompagnée de la *Beggiatoa alba*) ; quelquefois elle se développe à un tel degré qu'elle peut rendre l'eau impropre à tout usage. D'après M. Zopf, elle causa de grandes calamités dans les conduites d'eau de Berlin, de Lille et de certaines villes russes. Par suite de la faculté qu'elle possède de pouvoir emmagasiner des composés ferrugineux dans ses parois, elle forme dans l'eau des flocons rougeâtres ou bruns. Ses formes sont très belles ; elle se présente sous l'aspect de coques (a-f) qui, par division et sécrétion de matières visqueuses forment des zooglées. Ces coques peuvent aussi s'allonger en filaments articulés et munis d'un étui distinct (h, i-r). Ils augmentent en épaisseur vers le sommet, et lorsqu'ils ont atteint un certain âge, ils se séparent, à l'intérieur de l'étui, en plus petits membres, qui s'arrondissent et sortent comme bâtonnets, macrocoques ou microcoques, pouvant flotter dans l'eau. Nous ne possédons pas de connaissance plus exacte sur les conditions vitales de cette belle bactérie.

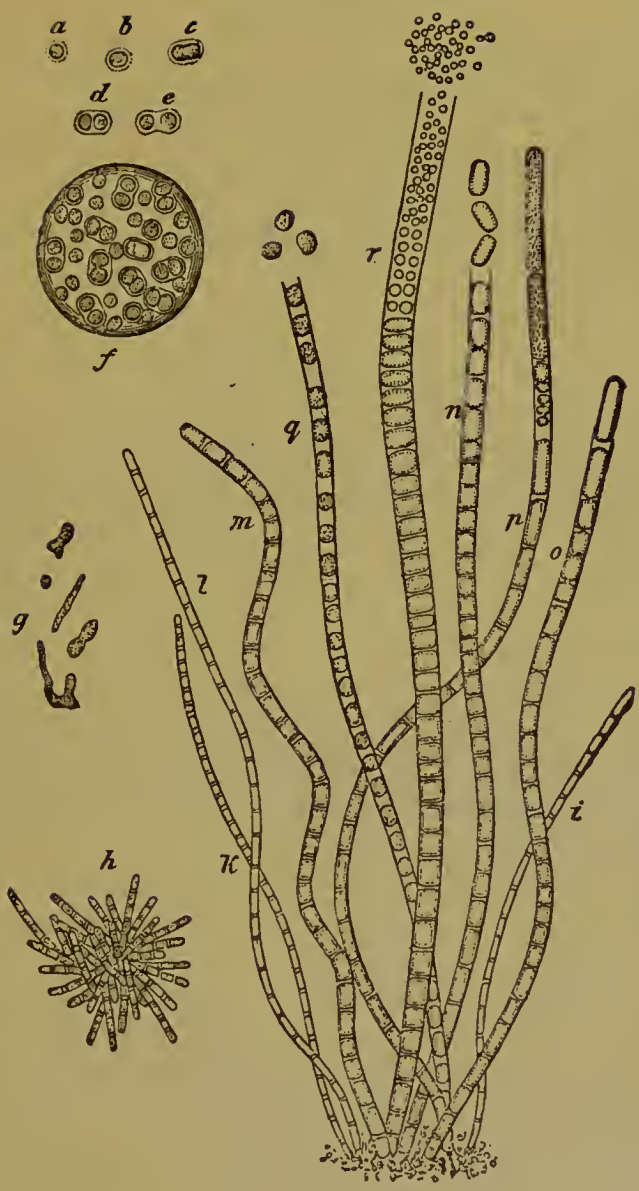

Fig. 16.

Crenothrix Kühniana, d'après Zopf.

a — **e** (600 : 1) coques dans diverses phases de division, **f** (600 : 1) petite zooglée ronde avec des coques, **g** zooglées (grandeur naturelle). **h** (600 : 1) colonie de filaments courts composés de cellules ayant la forme de bâtonnets et produits par la germination d'un petit amas de coques ; **i** — **r** filaments droits ou recourbés en spirale (**l**, **m**), de grosseur très variable, avec contraste plus ou moins prononcé entre la base et le sommet, dans différentes phases de divisions de leurs membres et formation d'étuis. Le filament à étui **r** montre des bâtonnets courts a sa base divisés en petites parties cylindriques vers le haut ; au sommet, on voit les coques provenant de la division longitudinale des disques cylindriques.

CHAPITRE IV

LES MOISISSURES

Les moisissures interviennent ordinairement dans l'industrie de la fermentation d'une manière quelque peu différente que ne le font les bactéries. Tandis que celles-ci apparaissent en grande quantité — dans les distilleries comme règle générale, dans les brasseries seulement exceptionnellement — et peuvent, par là, occasionner des changements importants dans le cours et dans les résultats de la fermentation ; les moisissures au contraire se présentent en dehors du champ proprement dit de la fermentation, s'installant sur les vases, sur les ustensiles, dans les divers locaux, sur le malt vert, sur la levure en repos et de préférence sur la levure haute. Par conséquent, les moisissures ont une importance plutôt subordonnée, mais néanmoins très réelle. Que l'on examine attentivement un de ces champs de moisissures qui se développent à la voûte ou sur les murs d'une cave de fermentation, ou sur les bords d'un vase, on reconnaîtra bientôt qu'on ne se trouve pour ainsi dire jamais en présence d'une seule végétation de moisissures *isolée*, et que l'on rencontre presque toujours parmi ses filaments des bactéries et des cellules de levure. Les filaments des moisissures poussent en hauteur et soulèvent ainsi les éléments étrangers qui, dans cette position exposée, sont plus facilement charriés soit par les ouvriers, soit par l'air. — Toutes espèces d'organismes microscopi-

ques prennent naissance pendant le maltage des matières premières féculentes. Si l'on considère ordinairement les moisissures comme les ennemis les plus dangereux, ceci tient certainement à ce que pendant leur développement, ils sont visibles à l'œil nu et qu'ils s'imposent ainsi d'une façon immédiate à notre attention. Si la *supériorité numérique* devait servir de base, c'est aux bactéries, qui abondent toujours sur le malt vert, que reviendrait certainement la première place. Jugé à ce point de vue là, on peut donc être dans le doute quand on se demande à qui l'on doit attribuer la plus grande influence sur le produit, si c'est aux moisissures (*Penicillium*, *Aspergillus*, etc.) lorsqu'on rencontre leurs luxuriantes végétations sur le malt, ou si ce ne sont pas plutôt leurs nombreux associés qui jouent ici le rôle prépondérant.

A la surface de petits morceaux de levure pressée, nous avons souvent trouvé une fine couche blanche, qui se composait le plus souvent d'un mycélium de moisissures appartenant principalement aux groupes *Chalara* et *Dematium*. Il est bien possible que lorsque ces plantes forment une couche assez épaisse à la surface de la levure, elles retiennent, par leur respiration, une partie de l'oxygène libre qui est indispensable à la levure pour pouvoir se conserver pendant assez longtemps en vie. Ici encore, nous avons toujours rencontré, sans exception, des formes bactériennes.

La vérité est donc, d'après les expériences faites dans la pratique, qu'une formation de moisissures peut presque toujours être considérée comme un signe, que d'autres organismes sans doute plus nuisibles et d'une action plus puissante, sont en voie de développement. Il est par conséquent très important que les murs des caves de fermentation soient *unis*, ce que l'on obtient le plus sûrement par l'emploi déjà très répandu des couleurs à l'émail.

Nous donnons ici un aperçu des principales formes de moisissures présentant de l'intérêt pour l'industrie de la fermentation.

I. — Botrytis cinerea.

La *Botrytis cinerea* (Fig. 17) forme de petits champs gris-jaune sur des matières végétales humides qui dépérissent, et se trouve également dans le moût. Du mycélium brun-grisâtre s'élèvent les filaments conidifères ayant l'aspect de tubes perpendiculaires et articulés, ordinairement arrangés en forme de touffes. Ils croissent jusqu'à la hauteur de 1 $^{m}/^{m}$, après quoi la cellule du sommet pousse près de son extrémité de 2 à 6 petites branches, qui forment un angle presque droit avec l'axe (C''). Les branches inférieures sont les plus longues; à leur tour elles donnent naissance au-dessous de leur extrémité à un ou plusieurs rameaux latéraux. Les branches supérieures sont presque aussi larges que longues. Il se développe ainsi un système de ramifications ayant l'aspect d'une grappe de raisins. La croissance longitudinale terminée, les rameaux séparent par une cloison transversale leur espace intérieur du tronc principal et cela tout près de celui-ci. En même temps, l'extrémité des rameaux et du tronc principal se gonflent en forme de globules et offrent à leurs surfaces supérieures plusieurs petites éminences, placées l'une à côté de l'autre. Celles-ci poussent rapidement en formant des vésicules ovales, remplies de plasma et se rétrécissant à leur base en forme de tube. Lorsque ces conidies (C') sont complètement développées, les parois des branches se resserrent, ce qui rapproche tellement les conidies les unes des autres, qu'elles finissent par former une agglomération lâche et irrégulière, qui se détache facilement. Si l'on place cette grappe dans de l'eau, les conidies se

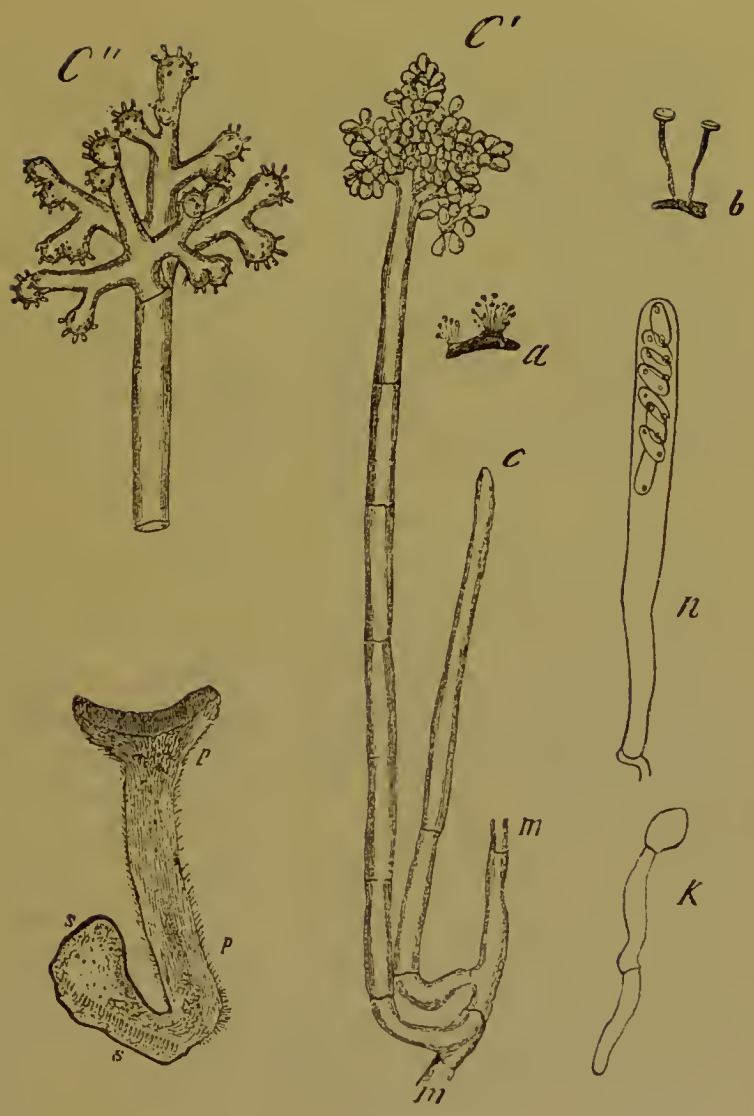

Fig. 17.

Botrytis cinerea, d'après de Bary.

a, b (grandeur naturelle) sclérotes, d'où croissent **a** des appareils conidiens, **b** des perithèces ; **c C'** filaments condifères (**C'** avec des conidies venant de mûrir) partant du tube mycélien **m** ; **C''** extrémité d'un appareil conidien montrant le commencement de la formation des conidies à l'extrémité des rameaux ; **k** conidie germinante (grossissement 300) ; **p, s** (faiblement grossi) coupe au travers d'un sclérote **s,** duquel pousse un petit périthèce (**p, p**) ; **n** asque isolé avec 8 spores mûres (grossissement 300).

dégagent de leurs pédoncules; les pellicules des rameaux vides de plasma se resserrent ou n'apparaissent plus que par traces; leurs anciens points d'attache au tronc principal ne s'aperçoivent plus guère que comme des petites cicatrices légèrement convexes. Le second membre du filament sporifère peut alors chasser celui de l'extrémité qui s'est resserré, pousser à son tour en hauteur et former une nouvelle grappe. Ceci pouvant se répéter plusieurs fois, les tubes conidifères atteignent une longueur considérable.

Dans de certaines conditions, cette plante peut entrer dans un *état particulier de repos* nommé *sclérote* (*scleros* = dur) (a, b, ss). Les filaments mycéliens se ramifient abondamment et les branches s'enchevêtrent en un corps continu, depuis la forme circulaire jusqu'à celle en fuseau étroit, et d'une grandeur variable pouvant atteindre jusqu'à quelques millimètres; les dernières extrémités des filaments deviennent brunes ou noires, et le sclérote solide et mûr se compose ainsi d'une enveloppe noire et d'un tissu intérieur incolore. De tels corps sont capables, après une période de repos — d'au moins une année — de donner naissance à une végétation nouvelle et peuvent à ce point de vue-là être comparés aux bulbes et aux racines des plantes supérieures. Si l'on porte le sclérote, peu après sa maturation, sur un milieu humide, les rameaux intérieurs incolores croissent au travers du contour noir et s'élèvent en filaments conidifères (a). Mais si l'on ne porte les sclérotes qu'après un repos prolongé sur le milieu humide, le tissu intérieur développe une grosse touffe de filaments qui croissent perpendiculairement et s'élargissent finalement en un disque en forme de plat (*b* et *ps*). Sur la surface supérieure libre du disque, les extrémités des filaments sont parallèles, quelques-unes restent grêles, d'autres se gonflent pour former des tubes semblables à des massues, dont chacun produit

dans son intérieur 8 spores ovales (n). La plante est alors entrée dans la période de sporulation. Les spores germent après avoir été expulsées et les fils germinatifs croissent en formant des appareils conidiens.

D'après MM. Bersch, Fitz et Reess, cette plante est considérée comme la cause d'une des maladies du vin, qui se manifeste par un goût et une odeur de fumée désagréables. De semblables cas de maladie ont été observés isolément dans la brasserie; il n'est cependant pas certain qu'ils provinssent de cet organisme.

2. — Penicillium glaucum.

Une forme de moisissure bien plus répandue dans l'industrie de la fermentation, et que l'on trouve surtout sur le malt vert, est le *Penicillium glaucum* (Fig. 18). Il forme sur le milieu une couche panniforme d'abord blanche, puis verdâtre ou d'un bleu gris et se développe avec une très grande rapidité. Le mycélium se compose de filaments transparents, ramifiés et cloisonnés qui, plongés dans des liquides, peuvent se gonfler irrégulièrement. De ces filaments partent les appareils conidiens (A), qui s'élèvent perpendiculairement. Ils consistent en cellules cylindriques allongées, dont la cellule terminale arrête bientôt sa croissance longitudinale pour prendre une forme subulée; la cellule sous-jacente pousse une ou plusieurs ramules opposées qui s'élèvent tout près de la cellule terminale et consistent, comme celle-ci, en *une* cellule subulée. Chez les exemplaires plus vigoureux, les branches peuvent encore se ramifier (voir Fig. 18 A, en-haut), ou bien il naît des cellules suivantes des rameaux semblables qui, comme cela a été dit plus haut, se ramifient et se terminent en pointe. Dans cette touffe de branches, chaque cellule subulée (*sterigma*) détache une série de conidies globuleuses, et finalement la touffe

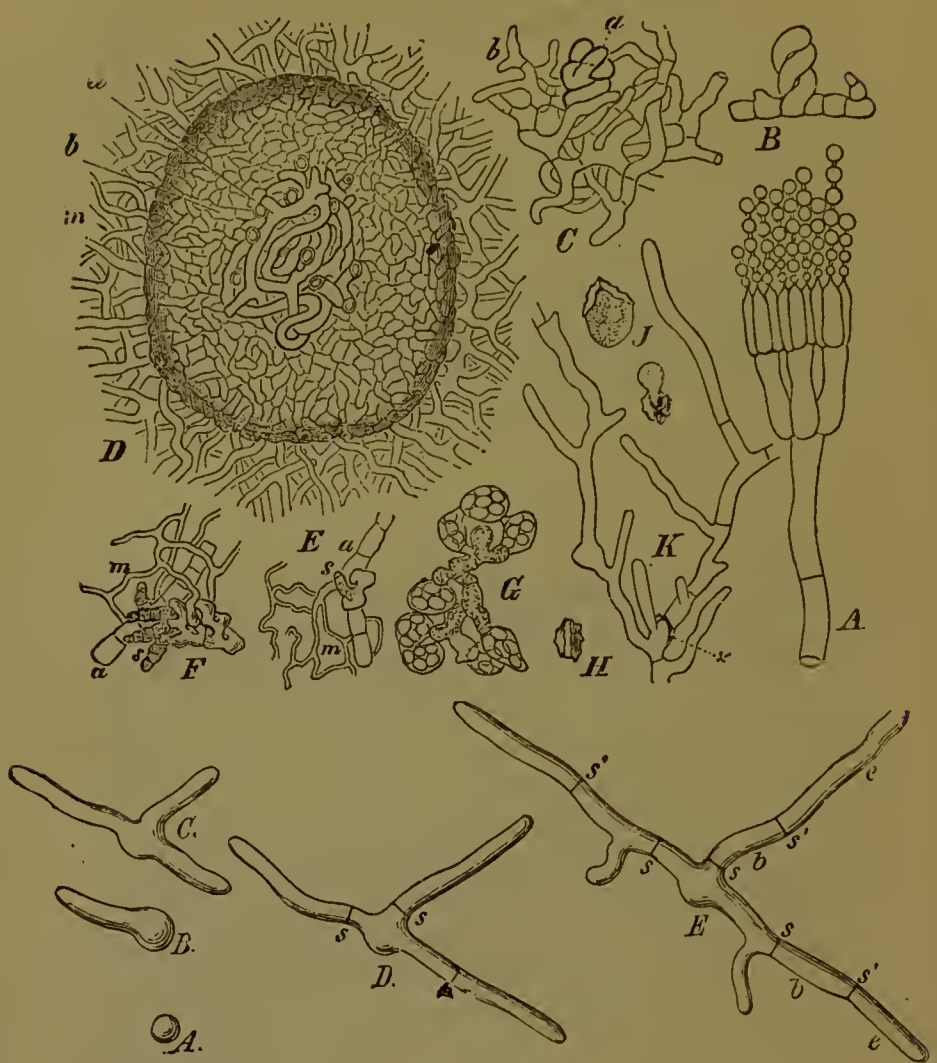

Fig. 18.

Penicillium glaucum, d'après Brefeld et Zopf

A Appareil conidien, **B** organes génitaux, **C** sclérote en voie de développement (**a** filaments fertiles, **b** filaments stériles); **D** coupe d'un sclérote très jeune (**a** filaments fertiles, **b** partie stérile du sclérote, **m** mycélium); **E** et **F** filaments fertiles (**a**) avec des jeunes asques (**s**) et des filaments mycéliens stériles (**m**) d'un sclérote plus développé; **G** groupe d'asques avec spores; **H** spore; **J** spores germantes; **K** jeune mycélium (près **x** la spore). — **A-E** (en bas). Germination de la conidie d'après Zopf (grossissement plus fort): **A** conidie avant la germination; **B** la même ayant développé un tube germinatif; **C** trois tubes germinatifs sont formés; **D** chacun de ces tubes est séparé de la spore par une cloison (**s**); **E** chaque tube germinatif s'est divisé par une nouvelle cloison (**s'**) en une cellule terminale et en une cellule intérieure (**b**)

porte une masse entière de conidies arrangées en séries qui sont facilement dispersées lorsqu'elles sont mûres. Ces conidies, rondes et unies, donnent au champ de moisissures sa couleur gris-bleu bien connue; quand elles sont semées sur des milieux humides, elles ont la faculté de germer immédiatement. Dans des essais de culture de cet organisme, Brefeld fit l'intéressante observation que dans de certaines conditions, le *Penicillium* pouvait présenter un mode de croissance toute différente. Il enferma des cultures de cette moisissure sur des tranches de pain bis sans levain, entre des plaques de verre, et les laissa se développer autant que possible à l'abri de l'air atmosphérique. On voit alors sur le mycélium des couples de branchettes courtes et épaisses s'enlaçant (*B* en haut); une partie de ces vis commence à pousser des tubes courts (C), tandis que le fil mycélien qui porte la vis produit de nombreux rameaux fins qui enveloppent la vis et forment une paroi (*D*), possédant une couche intérieure assez solide et une couche extérieure panniforme. Peu à peu les cellules intérieures se colorent en jaune et les cellules extérieures, plus lâches, sont repoussées. Dans ce petit globule jaune (*Sclerotium*) il s'opère, par une ramification continue des spirales mentionnées, une formation graduelle de cellules gonflées (*asques*) (*E*,*F*,*G*), dans lesquelles il naît chaque fois 8 spores. Celles-ci sont épaisses, lenticulaires, munies à leur périphérie d'une rainure circulaire et sur leur membrane extérieure (exospore) de 3 à 4 petites nervures. Après l'effondrement et l'absorption de tous les autres éléments intérieurs, les spores deviennent enfin libres et le petit globule jaune est rempli de la poussière des spores. Tout ce développement dure 6 à 8 semaines. Les sporocarpes peuvent être conservés à l'état sec pendant des années sans perdre leur propriété germinative. Quand on sème les spores (*H*), l'exospore se fend à la rainure circulaire pour

former comme une soupape, et l'endospore se gonfle et émerge (*I*) en s'allongeant en un tube germinatif, qui produit aussitôt les appareils conidiens.

Le *Penicillium* possède le pouvoir de sécréter un *ferment intervertissant* capable de convertir le sucre de canne en d'autres sucres.

3. — Eurotium Aspergillus glaucus.

Le développement de l'*Eurotium Aspergillus glaucus* (Fig. 19), a été décrit pour la première fois par le célèbre de Bary. Il forme une fine couverture panniforme, grisâtre ou d'un gris-vert, sur les corps les plus divers et peut apparaître en quantité exubérante sur le malt vert.

Comme dans le *Penicillium*, le mycélium se compose de filaments fins, cloisonnés, transparents et ramifiés. Quelques-uns des fils mycéliens s'élèvent perpendiculairement ; ils sont alors plus gros que les autres et ce n'est que par exception qu'ils sont ramifiés ou cloisonnés. Leur extrémité supérieure grossit pour former un renflement sphérique (*c*), qui pousse sur toute sa surface supé-

Fig. 19.

Eurotium Aspergillus glaucus, d'après de Bary.

m m filament mycélien portant un tube conidifère **c** (dont les conidies se sont détachées), un périthèce **F** et les premiers rudiments d'un ascogone **f** (grossissement 190 fois) ; **s** trois stérigmates du sommet d'un appareil conidien montrant le détachement des conidies ; **p** conidie en germination (grossissement 250-300 fois) ; **A** asque, **r** ascospore en germination, **k** tubes germinatifs ; **S** ascogone héliciforme. **p** premier rudiment d'un filament enveloppant, croissant en hauteur ; **T** phase de développement plus avancée ; **W** ascogone complètement entouré de l'enveloppe ; **V** coupe longitudinale d'une phase plus ancienne de développement, au centre l'ascogone entouré de l'enveloppe se composant de plusieurs couches ; **X** coupe longitudinale d'une phase de développement plus avancée ; l'ascogone est entouré d'une enveloppe ayant plusieurs couches, il a desserré ses tours et commence à pousser les rameaux formant les asques ; **M** partie d'une vieille branche fertile, **a** jeune asque, **a**$_1$ un viel asque rompu.

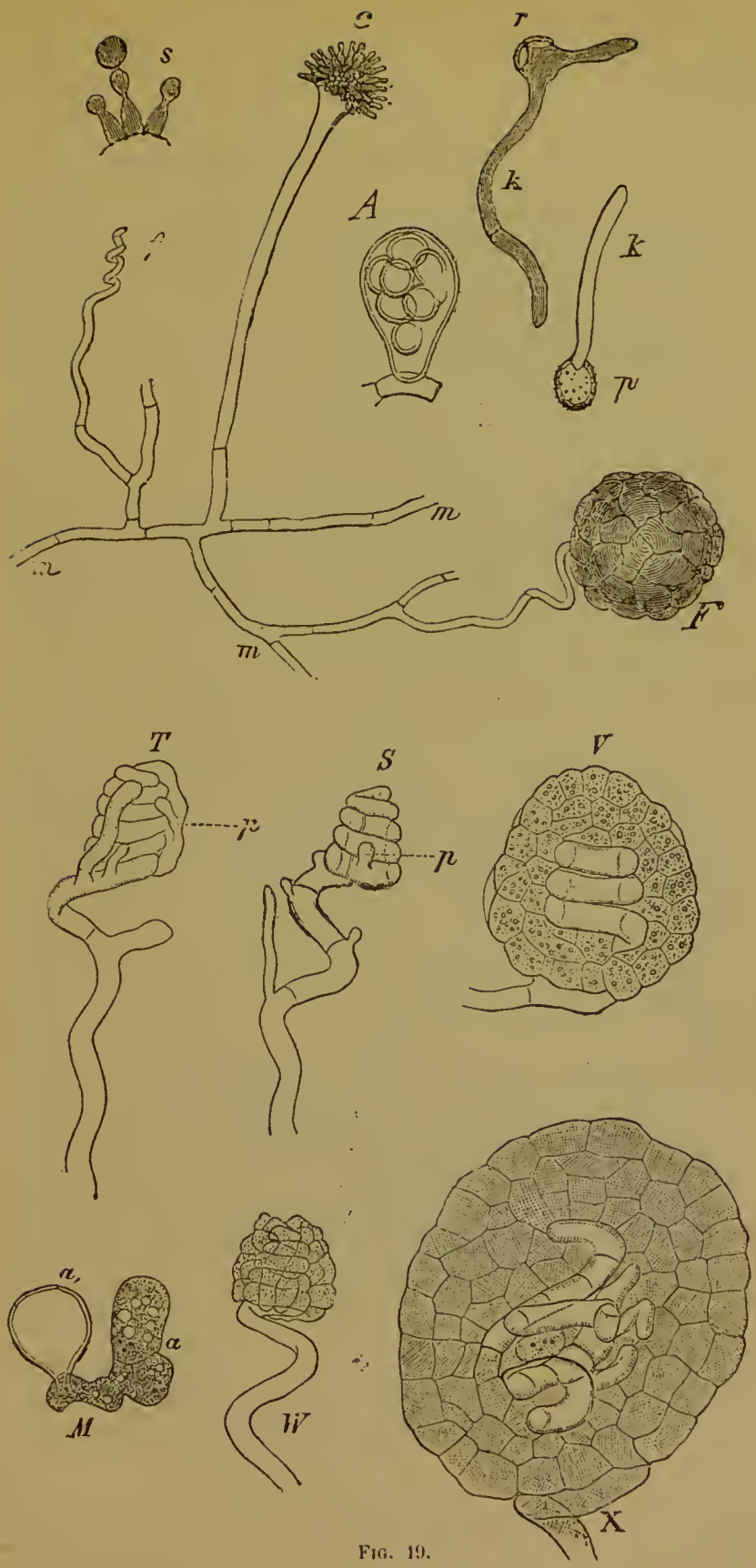

Fig. 19.

rieure des filaments cylindriques divergeant en forme de rayons. Ces stérigmates (*s*) poussent à leur tour à leur sommet de petites excroissances rondes, qui s'attachent par leur base fortement rétrécie aux stérigmates et forment quelque temps après des cellules indépendantes (spores ou conidies). Sous la ligne d'attache de la première spore il s'en forme une seconde au sommet du stérigmate ; celle-ci soulève la première : puis il s'en forme une troisième, et ainsi de suite. Chaque stérigmate porte un chapelet de spores, dont la plus jeune se trouve ainsi la plus rapprochée du stérigmate. Ceci a lieu en même temps sur toute la surface de l'extrémité gonflée du tube conidifère, qui, finalement, se recouvre ainsi d'une grosse tête de chapelets de spores arrangés en rayons. Cet amas de spores forme la poussière gris-vert qui recouvre la masse mycélienne. A la fin, les conidies se séparent l'une de l'autre. Elles sont à ce moment légèrement verruqueuses à leur surface. Ces corpuscules sont immédiatement à même de germer (*p*) et produisent aussitôt une nouvelle moisissure, ce qui explique la rapidité avec laquelle cette plante se propage. Dans de certaines conditions encore insuffisamment établies, mais qui paraissent, en tout cas, supposer une nutrition abondante, la moisissure développe des *perithèces*. Ceux-ci sont d'abord semblables à des rameaux délicats qui, après avoir terminé leur croissance longitudinale, commencent à tourner leur extrémité quatre à six fois en hélice, comme un tire-bouchon (*f*). Peu à peu les spires se rapprochent jusqu'à ce qu'enfin elles se touchent, de sorte que toute l'extrémité du filament finit par prendre la forme d'une hélice (*ascogone*). La spire inférieure de l'hélice développe alors deux ou plusieurs petits rameaux qui y sont fortement attachés. L'un de ces petits rameaux (*S*, *T*, *p*) devance l'autre dans sa croissance, et son extrémité supérieure atteint rapidement le sommet de

l'hélice, avec lequel il se fusionne. Le second rameau et tous les autres, s'il y en a plusieurs, s'élèvent également le long de l'hélice en se ramifiant et en se croisant de façon à ne former finalement tous ensemble plus qu'uné enveloppe compacte qui renferme l'hélice (*W*). Ces rameaux se divisent par des cloisons perpendiculaires à la surface, et l'enveloppe se trouve ainsi formée de cellulee courtes, anguleuses, dans lesqu'elles naissent de nouvelles cloisons parallèles à la surface, ce qui rend l'enveloppe plus épaisse en lui donnant plusieurs couches (*V*, *X*, *F*). Le petit globule désormais formé a environ 1/4 de millimètre d'épaisseur, la couche extérieure en devient jaune, tandis que celles de l'intérieur restent délicates et périssent plus tard. L'hélice enfin s'étend et pousse de tous les côtés des branches ramifiées qui repoussent les couches intérieures de l'enveloppe; ces branches prennent enfin la forme d'asques (*M* et *A*), dont chacun développe huit spores à l'intérieur. Après la rupture des asques, les spores restent éparses dans le sporocarpe et sortent par les crevasses de l'enveloppe devenue fragile.

Comme chez le *Penicillium*, les spores sont biconvexes, verruqueuses, possèdent une forte membrane extérieure et une intérieure qui, à la germination, fend la première pour en former deux valves (*r*).

Cette espèce possède un ferment *diastatique* transformant l'amidon en dextrine et en maltose.

Outre cette espèce, il s'en présente dans la nature encore plusieurs autres proches parentes qui peuvent, elles aussi, se rencontrer dans les mêmes localités. De la plupart de ces espèces, on ne connaît que la phase des conidies.

4. — Aspergillus Oryzae.

Pour la préparation du *vin de riz japonais* (saké) fortement fermenté, on emploie méthodiquement l'organisme appelé *Aspergillus oryzæ* (1). Les grains de riz débarrassés de leur balle se préparent à la vapeur, tout en évitant l'agglomération et l'agglutination des grains. Pour préparer un malt pouvant servir au brassage avec ces grains, qui sont incapables de germer et chez lesquels l'action diastatique ordinaire est par conséquent exclue, on mélange la masse de grains avec ce qu'on nomme le « *Tane Kosi* », c'est-à-dire avec des grains de riz enveloppés et recouverts du mycélium et des porte-sporanges de l'*Aspergillus oryzæ*. On peut aussi ne faire que mélanger la masse jaune-brune formée par les spores de la moisissure aux grains de riz échaudés. A l'air humide et chaud, il se développe sur le riz, dans l'espace d'environ trois jours, un mycélium blanc et velouté, qui donne à la masse un parfum agréable de pommes et d'ananas. Avant que la fructification ait lieu, on ajoute de nouvelles quantités de riz échaudé qui s'enveloppent également d'un mycélium, et l'on répète plusieurs fois cette opération. Dans la masse du koji ainsi produite, une partie de l'amidon a été transformée, et une part des substances albumineuses, auparavant insolubles, est devenue soluble. On brasse la masse du koji en mélangeant 21 parties de koji et 68 parties de riz cuit à la vapeur avec 72 parties d'eau. Abandonnée à elle-même à environ 20° C, cette masse en bouillie devient claire au bout de peu de jours, la saccharification de l'amidon et de la dextrine avance de plus en plus. Il se produit en même temps une fermentation spontanée très

(1) Recherches de MM. Ahlburg, Atkinson, Buesgen, Cohn, Ikuta, Kellner, Mori, et Nagaoka.

violente, occasionnée par un organisme du genre des levures qui n'est pas en rapport génétique avec *l'Aspergillus* et que l'on ne connaît pas d'une manière plus approfondie. Après deux ou trois semaines, la fermentation est terminée et le produit filtré est un liquide jaune, limpide, ressemblant au *sherry* et contenant de 13 à 14 0/0 d'alcool. Il est pasteurisé à 44. C dans des chaudières en fer.

M. Atkinson trouva dans le koji un ferment soluble dans l'eau intervertissant le sucre de canne, et qui convertit la maltose, la dextrine et l'empois d'amidon en dextrose. Les recherches de MM. Kellner, Mori et Nagaoka montrèrent également que la masse du koji possède un ferment fortement intervertissant, qui transforme le sucre de canne en dextrose et en lévulose, la maltose en dextrose, l'amidon en dextrine, en maltose et en dextrose. Les divers microorganismes qui se trouvent dans la masse du koji sont probablement porteurs de différents ferments intervertissants. M. Bourquelot avait déjà indiqué auparavant la présence de ces ferments intervertissants variés.

5. — Mucor.

Le genre *Mucor* appartient aux plus intéressants du groupe des moisissures qui nous occupent ici, car il contient des espèces ayant une action fermentative très prononcée. Elles apparaissent comme un feutre gris ou brun d'une hauteur quelquefois très considérable — jusqu'à quelques pouces, — dans lequel l'œil distingue de fins globules jaunes, bruns ou noirs.

Nous donnons ici la description des espèces qui sont le plus répandues.

Mucor mucedo (Fig. 20), une des plus belles formes de moisissure, qui se trouve par exemple très généralement

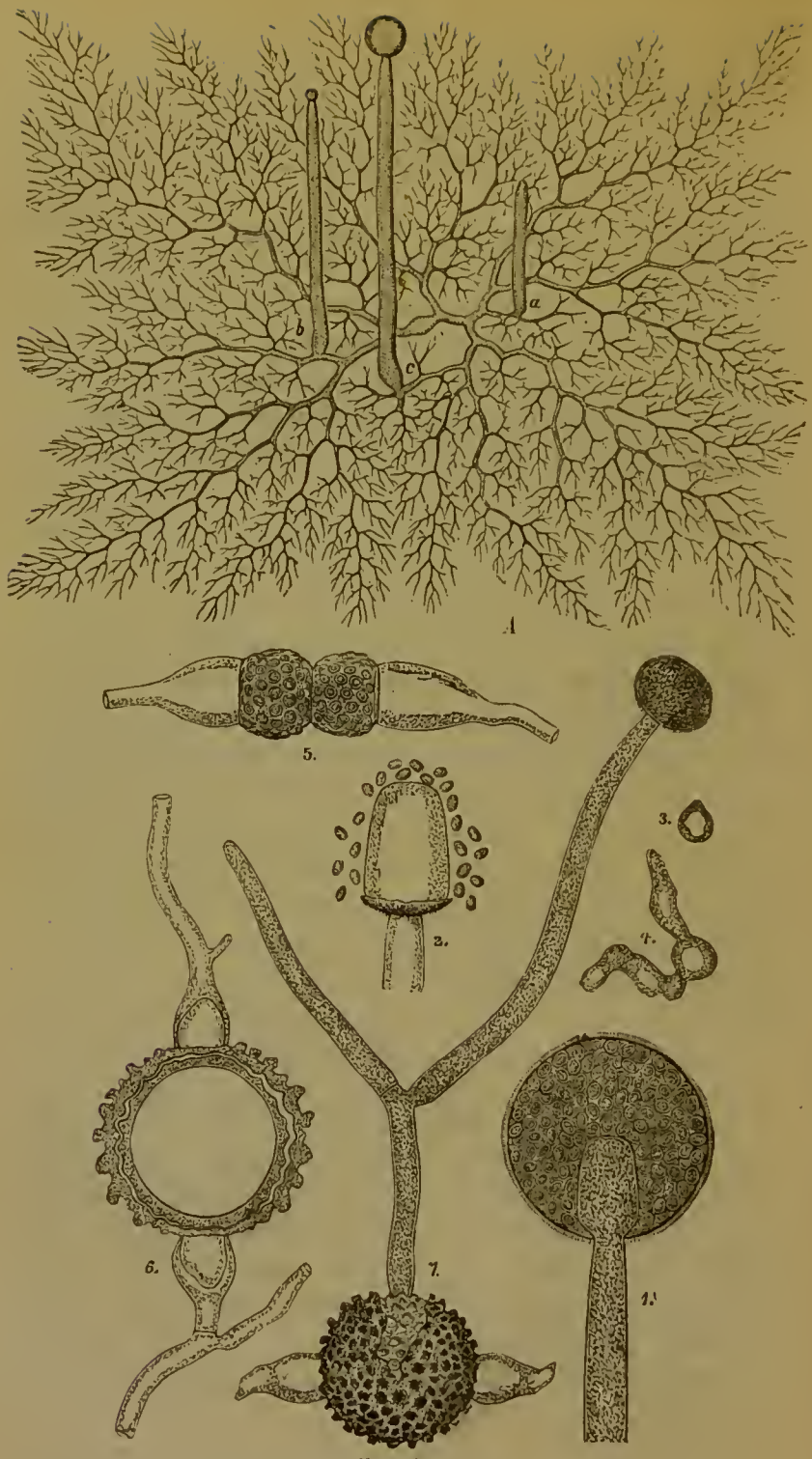

Fig. 20.

Mucor Mucedo, d'après Brefeld et Kny.

A Mycélium ramifié en forme d'arbre avec des branches assez épaisses, isolées, perpendiculaires (**a**, **b**, **c**), **1** sporange, **2** columelle et spores, **3**, **4** spores en germination, **5**, **6** développement de la zygospore, **7** zygospore en germination avec sporange.

sur le fumier des herbivores, a un mycélium blanc, transparent, formant à la surface et à l'intérieur du milieu nourricier de nombreuses ramifications très fines. Ce mycélium reste sans cloisons dans les premières phases du développement, jusqu'au commencement de la formation des sporanges, c'est-à-dire qu'il est unicellulaire. De ce mycélium s'élèvent des rameaux simples, vigoureux, les tubes sporangifères ; les extrémités de ces rameaux qui, d'après Zopf, contiennent une matière colorante grasse d'un jaune rougeâtre, se gonflent fortement, et sous ce renflement, il se forme finalement une cloison qui sépare le sporange du tube sporangifère. La cloison se recourbe vers le haut et forme une „ columelle " à l'intérieur du renflement sphérique, ce qui donne à l'espace intérieur une forme particulière (*1*). Le protoplasma de cet espace se divise en un grand nombre de particules qui s'enveloppent d'une membrane en s'arrondissant : ce sont les spores. En même temps, la surface extérieure du sporange se revèt de fins cristaux aciculaires d'oxalate de chaux. Dès que le sporange noir a mûri et qu'il prend de l'humidité, la paroi se dissout et les spores, munies du contenu jaune, sont dispersées de tous côtés avec le contenu gonflé du sporange. La « columelle », qui s'était élevée dans le fruit, se trouve encore a l'extrémité du tube sporangifère. Celle-ci est maintenant encore entourée d'un col, débris de la paroi du sporange (*2*). Les spores réfringentes enflent très fortement lorsqu'elles tombent dans un milieu nourricier convenable et projettent un ou deux fils germinatifs (*3*, *4*) qui développent rapidement un mycélium vigoureux.

Outre ce mode de reproduction, les mucorinées montrent encore une reproduction sexuelle qui a lieu par la conjugaison de deux rameaux du même mycélium. Deux de ces courts rameaux croissant l'un contre l'autre,

abondamment pourvus de plasma, forment des renflements claviformes et se touchent par leurs extrémités qui s'applatissent (5). Chacun de ces rameaux est alors divisé en deux cellules par une cloison transversale, et les cellules extrêmes (cellules conjuguées), qui sont en contact, se fusionnent par la dissolution de la cloison originale double qui les séparait. Les deux cellules conjuguées sont ou d'égale grandeur, comme c'est le cas chez le *Mucor mucedo*, ou inégales, comme chez le *Mucor stolonifer*. La nouvelle cellule ainsi formée, la *zygospore* (6), augmente rapidement de volume, se gonfle en forme de boule (chez le *Mucor stolonifer* en forme de baril), et la cloison devient épaisse et stratifiée; à l'extérieur elle est foncée et munie d'excroissances verruqueuses. Ces couches extérieures sont très réfractaires à l'action des acides. Le contenu est riche en substances de réserve (graisse). Les *zygospores* ne peuvent généralement germer qu'après un temps de repos assez long; le tube mycélien qui a poussé au travers des couches extérieures, développe immédiatement les sporanges qui ont été décrits (7). Nous trouvons donc dans la *zygospore* un *état de repos* de la plante et un organe permettant, par sa structure, à la moisissure de pourvoir à son existence pendant des périodes qui seraient défavorables à son développement.

Mucor racemosus, qui se trouve principalement sur le pain et sur des débris végétaux en décomposition, a des filaments sporangifères ramifiés, multicellulaires, pouvant également atteindre une hauteur considérable. Aux extrémités des rameaux se développent les sporanges brunâtres. Les spores sont incolores. Quand on cultive ce champignon dans du moût, le mycélium submergé enfle irrégulièrement; il se forme beaucoup de cloisons détachant de grosses cellules en forme de baril ou irrégulières, remplies de plasma réfringent. Ces cellules

(gemmes), se séparent facilement ; elles prennent alors, comme Bail l'observa en premier lieu, la forme de boules (voir Fig. 21,[7]) *et se multiplient ensuite par bourgeonnement, comme les cellules de levure proprement dites ; la même chose a lieu pour les spores submergées (levure mucor, levure sphérique)*. Il se produit aussi des formations gemmiformes lorsque le mycélium est cultivé sur des milieux solides. Le plasma des filaments s'accumule dans certaines places en masses compactes et il est alors isolé des deux côtés par une cloison transversale. En même temps la cellule se gonfle, les parois s'épaississent et à l'intérieur viennent s'emmagasiner des substances grasses. Les parties des fils mycéliens placées entre les cellules perdent peu à peu leur contenu.

Mucor erectus, apparaît par exemple sur des pommes de terre pourries et offre, vu au microscope, tout à fait la même structure que le *Mucor racemosus*, mais il en diffère physiologiquement (voir au bas).

Mucor circinelloides (Fig. 21) a un aspect très caractéristique. Le mycélium (*l*) a une ramification particulière qui se trouve chez quelques mucorinées. Les branches principales (*b*) déploient des rameaux latéraux courts, radicellaires, fourchus en plusieurs points (*c*) ; de leur base partent de nouveaux rameaux mycéliens (*r*) qui s'élèvent et peuvent développer des sporanges (2-5) ; les filaments sporangifères sont ramifiés. Pendant leur développement, on les voit former de fortes courbes, auxquelles la plante doit le nom de circinelloides. Chez cette espèce comme chez le *Mucor spinosus*, — dont les sporanges brun chocolat se distinguent par leur columelle munie à son extrémite supérieure d'excroissances pointues et épineuses, — le mycélium produit les mêmes développements gemmiformes que chez le *Mucor racemosus* et le *Mucor erectus*, lorsqu'il est submergé dans un liquide sucré.

Fig. 21.

Mucor circinelloides, d'après van Tieghem et Gayon

1 Mycélium ; b branche principale, c rameaux radicellaires; 2-4 développement de sporanges ; 5 sporanges ouverts: 6 spores ; 7 mycélium submergé et cellules bourgeonnantes.

Mucor stolonifer (*Rhizopus nigricans*) atteint une grandeur considérable et se présente très généralement, par exemple sur les fruits juteux. On reconnaît facilement ce champignon, parce que son mycélium brun-jaune pousse obliquement en l'air des tubes épais sans cloisons. Ceux-ci atteignent une longueur d'environ 1 c/m puis leur pointe s'incline vers le *substratum* et ils développent des tubes grêles, abondamment ramifiés, qui poussent comme des radicules dans le milieu nourricier, tandis que d'autres tubes s'élèvent perpendiculairement en produisant des sporanges. D'autres branches forment ensuite de nouveau stolons. Le sporange noir possède une haute columelle en forme de dôme et développe un grand nombre de spores d'un brun foncé, rondes, ou anguleuses. Lorsque ces dernières sont devenues libres par la résorption de la membrane du sporange, la columelle se retourne comme un parapluie sur le tube sporangifère, auquel la ligne de jonction reste visible sous forme d'une petite collerette.

Les mucorinées présentent, à notre point de vue, un intérêt tout particulier, parce qu'elles sont capables d'agir à des degrés différents comme *ferments alcooliques*. Comme il a été mentionné plus haut, quelques mucorinées, immergées dans un liquide sucré fermentescible, changeront rapidement d'aspect. Tandis que la plante ressemble, déjà extérieurement, aux champignons du genre de la levure, elle provoque en même temps une véritable fermentation alcoolique, car elle dégage de l'alcool et de l'acide carbonique comme produits principaux de fermentation. Si ces membres libres de la plante sont ramenés à la surface par les bulles d'acide carbonique, ils peuvent de nouveau donner naissance à des formes de moisissure. La plupart des espèces de *Mucor* possèdent la faculté de provoquer une fermentation alcoolique, mais à des degrés différents ; cependant

l'activité fermentative ne se rattache pas exclusivement aux développements gemmiformes bourgeonnants mentionnés plus haut, car ceux-ci n'ont pas été observés ni chez le *Mucor mucedo*, ni chez le *Mucor stolonifer*.

D'après les recherches les plus récentes de Hansen, les mucorinées, tant qu'elles sont du moins à considérer comme des ferments alcooliques, provoquent une fermentation non-seulement dans des solutions de dextrose et de sucre interverti, mais encore dans celle de la maltose. Parmi les espèces étudiées par lui, il n'y a que le *Mucor racemosus qui soit capable d'intervertir une solution de sucre de canne*; les autres ne peuvent, par conséquent, pas provoquer de fermentation dans cette même solution.

Le *Mucor erectus* possède la plus vigoureuse puissance fermentative. Dans du moût de bière de concentration ordinaire — 14 à 15° Balling — il forme jusqu'à 8 0/0 d'alcool en volume. Il provoque aussi une fermentation alcoolique dans des solutions de dextrine et transforme l'amidon en sucre réductif. Le *Mucor spinosus* forma dans du moût de bière jusqu'à 5,5 0/0 d'alcool en volume, dans une solution de maltose on observa des phénomènes de fermentation manifestes, et au bout de huit mois, le liquide contenait 3,4 0/0 d'alcool en volume. Le *Mucor mucedo* fait voir une puissance fermentative relativement faible, tant dans le moût (jusqu'à 3 0/0 d'alcool en volume) que dans des solutions de maltose et de dextrose. Le *Mucor racemosus* forme dans le moût jusqu'à 7 0/0 d'alcool en volume; il développe de l'invertase et fait fermenter le sucre de canne interverti; cette espèce se distingue par là, comme on l'a dit plus haut, de toutes les autres mucorinées.

D'après Gayon, le *Mucor circinelloïdes* est sans effet sur le sucre de canne, tandis qu'il exerce une action fermentative très prononcée sur le sucre interverti (5,5

pour 100 d'alcool en volume). M. Gayon en conclut que ce champignon pouvait être employé avec avantage dans les raffineries, pour extraire le sucre de canne des mélasses. Autant que nous avons pu nous en informer, cette observation n'a pas été utilisée en pratique.

6. — Monilia.

Sous le nom de *Monilia* (Fig. 22) on trouve dans les ouvrages traitant de la mycologie, la description d'un grand nombre de moisissures différentes d'une structure relativement simple. D'un mycélium qui varie de couleur selon les espèces, s'élèvent des branches dont se détachent des séries de spores ovoïdes ou elliptiques. Ce genre de moisissures a, dans ces derniers temps, attiré l'attention, parce qu'une de ses espèces, que Hansen avait nommée provisoirement *Monilia candida*, d'après la description de Bonorden, offre, au point de vue physiologique, des propriétés remarquables. Elle apparaît dans la nature comme une couche blanche sur du fumier de vache frais et sur des fruits doux et juteux. Transportée dans du moût, elle donne lieu à une abondante végétation de cellules ayant l'aspect de levure et ressemblant au *Saccharomyces ellipsoïdeus* ou *cerevisiæ*. Elle provoque en même temps une forte fermentation alcoolique et couvre le liquide, pendant que celle-ci est encore en activité, d'un voile mycodermique. Dans ce voile les cellules s'allongent de plus en plus pour former finalement un véritable mycélium. Pendant la première période, cet organisme ne forma que 1,1 0/0 d'alcool en volume, tandis que le *Saccharomyces cerevisiæ* en formait 6 0/0 ; mais la *Monilia* continua la fermentation tandis que la levure de culture s'arrêta à cette quantité, Au bout de six mois, la *Monilia* avait formé 5 0/0 d'alcool en volume.

D'autres expériences entreprises avec ce champignon

Fig. 22. — A.

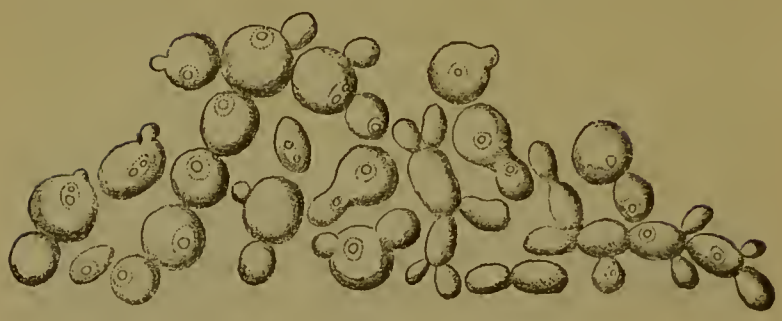

Fig. 22 — B.

Monilia candida, d'après Hansen.

A Végétation dans du moût de bière ou d'autres liquides nourriciers sucrés.

B Cellules d'une jeune formation de voiles.

C Végétation de moisissures. Les formes comme **a** sont fréquentes : elles se composent de chaînes de cellules allongées, plus ou moins filiformes, et assez faiblement reliées entre elles ; à chaque articulation se trouve ordinairement une couronne de cellules de levure ovales, qui tombent facilement. **b** représente une autre forme fréquente mais qui se distingue de la précédente par l'absence des cellules disposées en couronne, lesquelles sont remplacées par une branche analogue à celle qui forme la tige mère, mais plus courte. Il n'est pas rare que les articles qui forment ces chaînes soient étroitement unis entre eux. Les étranglements disparaissent dans beaucoup de cas et il naît un mycélium tout à fait typique avec des cloisons distinctes (**c**). Les formes **b** et **c** se trouvent dans le milieu nourricier, **a** ordinairement à la surface. Les formes comme (**d**) ont beaucoup de ressemblance avec l'*Oïdium lactis*. **e** nous montre une chaîne de cellules pyriformes avec des couronnes de cellules de levure ressemblant au *Saccharomyces exiguus*. La chaîne de cellules en forme de citron représentée par **f** correspond exactement aux dessins d'Ehrenberg de l'*Oïdium fructigenum*. On trouve parmi les formes principales décrites de nombreuses cellules de levure de différentes formes et réunies en colonies différemment groupées. Comme c'est ordinairement le cas, il s'en présente aussi comme le *Saccharomyces conglomeratus Rees*.

Fig. 22 — C.

eurent pour résultat remarquable, *qu'il n'avait pas le pouvoir de sécréter le ferment chimiquement soluble, l'invertase, et qu'il faisait néanmoins fermenter le sucre de canne comme sucre de canne.* On sait que le sucre de canne avait jusqu'à présent toujours été considéré comme *n'étant pas directement fermentescible.* Hansen a démontré ainsi, que cette proposition n'était pas vraie d'une manière générale.

Ses expériences ont de plus établi que cette espèce *faisait aussi fermenter la maltose.* Comme la *Monilia* ne forme pas d'invertase, tout en étant néanmoins capable de provoquer une fermentation dans des solutions de maltose, il en résulte *qu'une conversion préalable de la maltose en dextrose n'était pas de rigueur pour faire fermenter cette espèce de sucre.*

Les liquides contenant les différentes espèces de sucre mentionnées plus haut, accusèrent pendant la fermentation la présence d'acide carbonique et d'alcool éthylique.

Enfin il faut encore ajouter que cette moisissure se distingue par la facilité avec laquelle elle supporte les températures élevées. Dans du moût de bière et dans des solutions nourricières de sucre de canne, elle se développe vigoureusement à 40° C. et provoque, à cette température, une fermentation énergique.

7. — Oïdium lactis.

Une moisissure qui a joué un rôle important dans la littérature de la physiologie de la fermention et dans la littérature médicale, c'est l'*Oïdium lactis* (Fig. 23) ou « levure de l'acide lactique. »

Une partie de ces communications a pour but de démontrer que cette moisissure ne représente qu'une phase du développement de certaines espèces qui, dans d'autres circonstances, apparaissent sous des for-

Fig. 23.

Oïdium lactis, d'après Hansen.

1 Filaments fourchus à leur sommet. **2** Deux extrémités de filaments, dont l'une montre une dichotomie à son début et l'autre commençant à détacher un article sphérique. **3-7** Conidies en germination. **6-6'''** La germination d'une conidie inoculée dans du moût de bière houblonné, dans la chambre humide de *Ranvier*, représentée dans plusieurs états de développement. Chaque extrémité a produit des tubes germinatifs ; au bout de 9 heures (**6'''**), les fils germinatifs se sont cloisonnés et ont formé les premières traces de ramification. **11-14** Formes anormales. **15, 16** Filaments avec cellules interstitielles remplies de plasma. **17** Chaîne de conidies en train de germer. **18** Conidies qui ont séjourné longtemps dans de l'eau sucrée ; le contenu montre des gouttes huileuses. **19** Vieilles conidies.

mes et avec des propriétés absolument différentes. Elle fut mise ainsi en rapport génétique avec des bactéries, avec la *Chalara* (voir plus loin), avec les *Saccharomyces*, etc. Brefeld, ainsi que Hansen, ont exécuté de nombreuses expériences et des essais de culture avec cet organisme, et ils les ont continués pendant longtemps, sans cependant réussir à produire d'autre forme que celle qui est propre à l'Oïdium. Il est vrai que dans ces derniers temps, Brefeld a observé chez plusieurs champignons d'un ordre plus élevé, une formation de conidies apparaissant en chaînes oïdiennes. Il n'a jusqu'à présent pas été établi, si parmi ceux-là se trouvait aussi compris l'espèce que nous désignons par le nom d'*Oïdium lactis*.

Fresenius donna avec raison à ce champignon le surnom de *lactis* (du lait) ; car toutes les expériences ont jusqu'à présent démontré qu'il avait son siège ordinaire dans le lait, où l'on peut le rencontrer la plupart du temps. On n'a, par contre, fourni aucune preuve pour que cette moisissure joue un rôle dans les fermentations acides du lait. Elle apparaît en outre spontanément sur les liquides les plus variés, entre autres sur les mélanges sucrés que l'on utilise dans l'industrie de la fermentation, et elle peut y provoquer une faible fermentation alcoolique.

Les filaments (*1*) souvent fourchus, rameux, à parois minces, transparents, forment comme une couche de feutre épaisse et blanche. Dans la partie supérieure des filaments, il se forme des cloisons très rapprochées, après quoi les cellules remplies d'un plasma très réfringent se détachent comme conidies (*3-7*, *11-14*, *17-19*). Quand le champignon croît sur un milieu solide, les filaments se rejoignent en formant de bizarres corps coniques. En coupe longitudinale, les conidies se présentent généralement sous une forme rectangulaire à coins arrondis (*3*, *6*, *17-19*) ; on trouve cependant presque toujours dans une végétation de cette moisissure en même temps des coni-

dies sphériques, ovales, pyriformes ou tout à fait irrégulières (*1, 5, 11-14*). De ces organes reproducteurs, les seuls connus, sortent un ou deux fils germinatifs. Ce champignon peut survenir dans la bière, surtout quand elle est pauvre en alcool. Dès que la quantité d'alcool augmente, les conditions de développement deviennent moins favorables. Cependant ni le moût ni la bière ne sont exposés à être sensiblement attaqués par l'Oïdium, attendu que celui-ci n'est pas capable de lutter avec les organismes concurrents, qui apparaissent aussitôt que des liquides fermentescibles sont exposés aux germes suspendus dans l'air.

Dans nos nombreuses études sur la levure haute, nous avons observé que la moisissure en question y trouvait un milieu nourricier très favorable, surtout lorque la levure était en repos, la fermentation principale une fois terminée. Quelquefois l'examen microscopique révéla la présence d'un nombre énorme de ses conidies. On ne connaît pas l'influence d'une telle végétation sur la qualité de la levure ou de la bière ; il est sans doute prudent d'éviter ce champignon autant que possible.

8. M. C.-G. Matthews a observé que la coloration rouge qui se voit sur les grains de malt, surtout quand ils sont de qualité inférieure, provenait d'un *Fusarium* (probablement *graminearum*). Il cultiva cette moisissure sur divers milieux. Les spores arrangées en touffes sont fusiformes. recourbées, uni ou multicellulaires ; elles sont incolores ou seulement très faiblement colorées, mais dans la préparation, elles étaient prises dans une masse fortement colorée. La formation des moisissures commence à l'extrémité germante du grain, d'où elle s'étend alors plus ou moins sur toute la surface. Quand de tels grains se mettent à germer, si toutefois cela arrive, ils présentent un développement anormal en ne poussant soit que quelques

radicelles isolées très grêles, soit une plumule seule. Tandis que les spores de *Penicillium*, *Mucor*, *Aspergillus*, etc., sont facilement charriées par l'air et répandues sur toute la couche de malt, les grains attaqués par le *Fusarium* ne peuvent, d'après M. Matthews, communiquer cette moisissure qu'aux grains voisins, probablement parce que ces spores sont plus lourdes et qu'elles adhèrent plus fortement au fil mycélien.

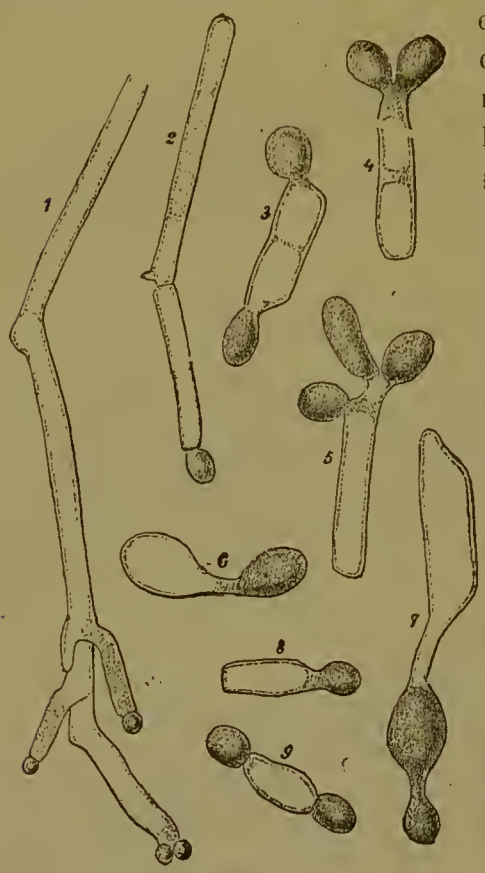

FIG. 24.

Chalara Mycoderma, d'après Hansen.

1 Filament ramifié, dont les articles terminaux se divisent en conidies; 2 Filament dont la cellule supérieure porte un stérigmate, la partie attenante à la cloison ayant développé des conidies; 3-9 Articles des filaments de différentes formes développant des conidies.

9. *Chalara Mycoderma* (Fig. 24) est signalée dans les « *Études sur la bière* » de Pasteur, comme habitant les grains de raisin. Le mycélium forme un voile à la surface des liquides et consiste en filaments ramifiés, tirant sur le gris, souvent remplis d'un plasma très réfringent dont se détachent en divers points des conidies de forme et de grandeur inégales. Cienkowski a, dans son mémoire sur les

champignons des voiles, donné la première description détaillée de la *Chalara*, Hansen observa que cette moisissure croissait sur le moût ordinaire et sur la bière de garde.

10. Une moisissure sur laquelle on a beaucoup écrit et qui se rattache à notre sujet, mais dont l'importance pratique n'est certainement pas en rapport avec l'intérêt qu'on lui a porté, c'est le *Dematium pullulans* (Fig. 25), qui a été décrit en premier lieu par de Bary, et ensuite par Loew. Il est surtout sur les fruits, principalement sur les raisins, et possède un mycélium rameux poussant des bourgeons qui ont une ressemblance frappante avec les cellules de levure ordinaires (4). Ces bourgeons peuvent, comme les levures, se propager à leur tour à travers plusieurs générations, de nouveau par bourgeonnement, ou bien former des fils germinatifs qui produisent un mycélium (3). Quand ce dernier a atteint un certain âge, il forme de nombreuses cloisons très rapprochées et devient peu à peu brunâtre ou vert-olive (5) ; ceci caractérise la phase de repos de la plante. Dans ses analyses d'air, Hansen rencontra très fréquemment, depuis le printemps jusqu'à la fin de l'automne le *Dematium* sur du moût exposé à l'air. Il observa que lorsque ce champignon était semé dans des liquides sucrés, il ne développait au commencement que des fils mycéliens ; mais au bout de quelque temps, les cellules, qui ont l'aspect de levure, se détachent sans provoquer de fermentation alcoolique. Pasteur a décrit d'une manière détaillée cette plante dans ses « *Études sur la bière* ». Comme elle abonde à la surface des raisins, où la levure de vin se développe aussi, et que cette dernière a souvent la même apparence que les cellules de la levure *Dematium*, on pouvait supposer que ses conidies et les cellules de levure de vin (*Saccharomyces*) étaient identiques. Pasteur,

s'exprime à ce sujet différemment en différents endroits

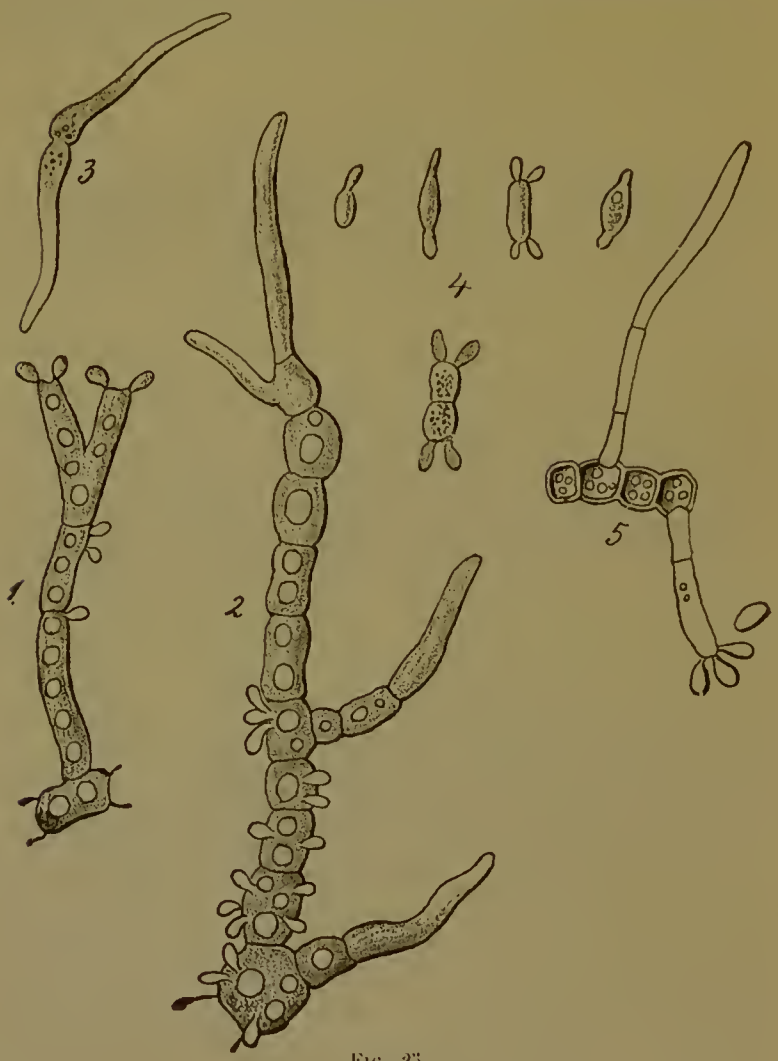

Fig. 23

Dematium pullulans, d'après Loew.

1,2 Filaments mycéliens arrivés au terme de leur croissance avec cellules ressemblant à des levures; 3 Cellules de cette dernière espèce se développant en fils mycéliens; 4 Cellules ressemblant à des levures en bourgeonnement; 5 Apparition de cellules ressemblant à des levures aux tubes germinatifs des cellules à parois brunes.

de l'ouvrage mentionné. Dans certains cas, il considère

cette identité comme une hypothèse, dans d'autres, au contraire, comme un fait évident. Ici encore nous avons un exemple des efforts mentionnés précédemment, de ramener les levures (*Saccharomyces*) aux moisissures. D'après les méthodes de recherches actuelles, la question n'est plus douteuse : les levures de vin proprement dites peuvent, dans de certaines conditions connues à présent, produire des spores à leur intérieur ; dans les mêmes circonstances, les conidies du *Dematium* ne développent pas de spores et diffèrent par conséquent de la levure de vin. Il existe plusieurs espèces de *Dematium* ; M. Lindner nous communique qu'une d'elles rend le moût filant si elle se développe dans ce liquide.

11. Enfin nous citerons une moisissure pouvant se présenter dans des liquides fermentescibles et dans les caves de fermentation ; c'est le *Cladosporium herbarum*. Ce champignon se présente quelquefois en très grande quantité dans les caves de fermentation. Il y a quelques années, nous avons trouvé le plafond et une partie des murs d'une cave de fermentation basse recouverts d'une foule de petites taches noires. Celles-ci étaient formées par cette moisissure, c'est pourquoi nous en retrouvions toujours les conidies dans la levure. La plante est un mycélium jaune-brun avec des filaments courts, droits, raides et cassants, et ceux parmi ces derniers qui croissent en l'air, peuvent produire à leur extrémité supérieure, des conidies de formes extrêmement variées : sphériques, ovales, cylindriques, droites ou recourbées. La classification systématique de ce champignon et son rapport génétique possible avec d'autres moisissures connues sont aussi peu établis que son influence sur le liquide nourricier. Eriksson indique que le seigle est quelquefois attaqué par le *Cladosporium*, et que cette moisissure, introduite par du pain ou de la bière provenant

de seigle contaminé, pouvait produire des maladies chez l'homme.

Pour ce qui concerne cette forme ou d'autres formes analogues, Zopf donne des descriptions morphologiques détaillées, accompagnées de nombreuses illustrations, dans son mémoire sur le *Fumago* ainsi que dans son traité sur les champignons. Ceux de cette dernière espèce, qui produisent la maladie appelée fumagine, apparaissent très fréquemment sur des végétaux. Franck dit avec raison que nous sommes encore complètement dans l'obscurité en ce qui concerne les différences spécifiques ; la cause en est principalement dans le fréquent polymorphisme de ces organismes, et dans le fait, que les diverses formes de développement ne se rencontrent presque jamais ensemble.

CHAPITRE V

LES FERMENTS ALCOOLIQUES

INTRODUCTION

Etant donné le cadre restreint d'un ouvrage du genre de celui-ci, il est impossible de faire un exposé historique et détaillé des connaissances des temps passés. On ne pourra traiter que de ce qui est absolument indispensable pour l'intelligence exacte de l'état actuel du sujet. Comme les travaux des dix dernières années avaient pour origine, d'une manière plus ou moins directe, des questions pratiques, les résultats obtenus sont tout naturellement appelés à être introduits dans la pratique et à y être utilisés. Ceci ne peut, il est évident, se réaliser que si *les points de vue essentiels* des travaux scientifiques ont été bien compris. Le but de l'exposé suivant est d'en faciliter l'intelligence.

Le terme « *ferments alcooliques* » employé dans son sens général est très collectif. Les moisissures ainsi que les bactéries et les champignons bourgeonnants peuvent occasionner une fermentation alcoolique. Nous ne nous occuperons ici que de ces derniers. Parmi les *champignons bourgeonnants*, il existe *plusieurs espèces qui peuvent se présenter accompagnées d'un mycélium*, tandis qu'une telle forme de développement *est dans la règle inconnue pour les autres espèces. Dans cette dernière catégorie de champignons bourgeonnants, on distingue de nouveau,*

sous le nom de SACCHAROMYCES, *un groupe spécial pouvant former des spores endogènes.*

Déjà en 1839, Schwann observa qu'à l'intérieur de certaines cellules de levure se formaient de nouvelles cellules qui devenaient libres par suite de la rupture de la membrane de la cellule-mère. C'est J. de Seynes, qui le premier donna, en 1868, une description exacte des spores dans les cellules de levure. Peu après, en 1870, Reess constata cette même formation chez plusieurs espèces, et annonça que la germination de ces cellules avait lieu par bourgeonnement. Autant que les très imparfaites méthodes d'investigation de l'époque le permettaient, on admit comme probable l'existence d'un groupe indépendant de ces champignons bourgeonnants. Reess désigna ce groupe par le nom générique de *Saccharomyces.* (Il comprit dans ce genre, et cela avec bien moins de conséquence, des espèces ne formant pas de spores, et il fut suivi sur cette voie par de Bary, qui écrivit une « Morphologie et biologie comparée des champignons », 1884. Reess renversa ainsi lui-même immédiatement la classification systématique qu'il venait d'entreprendre). Les conditions dans lesquelles de tels organes de reproduction apparaissaient dans les cellules, n'étaient cependant pas connues ; les expériences s'exécutaient au hasard, sans méthode déterminée. Dans l'ouvrage mentionné, Reess indiqua un système de classification des *Saccharomyces*, qui ne se base que sur les dimensions et sur les formes des cellules. Une telle classification en espèces, ne reposant que sur des caractères microscopiques, a été reconnue sans valeur aucune ; il est donc impossible de distinguer les espèces par les caractères qu'indique Reess. Ses travaux ne purent par conséquent obtenir une valeur vraiment pratique. Comme les conditions essentielles pour la production de la sporulation lui restèrent autant inconnues qu'à son successeur Engel, et que cela dépen-

dait du hasard, si l'on obtenait ou non des cellules en sporulation dans une culture de *Saccharomyces*, on comprendra facilement pourquoi, dans les années suivantes, l'existence des spores fut mise en doute, et pourquoi on arriva à discuter la question de savoir si les races employées dans la pratique avaient ou non perdu leur propriété de former des spores intérieures. Brefeld crut enfin pouvoir affirmer que cette propriété faisait entièrement défaut dans la levure de culture. On ne sortit de cette confusion que lorsque Hansen eut trouvé les *lois de la sporulation* et qu'il eut basé sur elles une méthode.

Les « *Études sur la bière* » de Pasteur parurent en 1876. Ce livre a, sous plusieurs rapports, enrichi nos connaissances des phénomènes se rattachant à la fermentation. L'opinion déjà fortement soutenue par lui dans ses écrits précédents, savoir, que toute fermentation et toute pourriture était suscitée par des microorganismes, forme le contenu principal de son ouvrage. C'est avec raison qu'on associa le nom de Pasteur à cette doctrine importante, car c'est principalement par ses recherches que cette doctrine fut fondée et rendue appréciable. Nous pouvons suivre les traces des idées qui y conduisirent, en remontant bien des années. Déjà du temps de Linné, plusieurs savants, parmi lesquels Linné lui-même, étaient d'avis que tout procès de fermentation ou de putréfaction était causé par des organismes microscopiques ; mais ce n'est que plus tard qu'on put en fournir les preuves. Ainsi qu'il a été dit plus haut, Cagniard-Latour démontra, en 1836, que les levures de bière et de vin se composaient de cellules se reproduisant par bourgeonnement, et que ces cellules provoquaient la fermentation alcoolique. Peu après, Schwann arriva au même résultat. Déjà en 1838, l'idée fut exprimée que les différentes fermentations étaient provoquées par différents microorganismes. Turpin

prononça, à cette époque, la proposition suivante : « Point de décomposition de sucre, point de fermentation sans l'acte physiologique d'une végétation. » Je renvoie d'ailleurs à l'exposé de ce principe qui a été fait précédemment (page 13) et qui se rattache, dans le développement historique, exactement à la théorie de la génération spontanée.

Des découvertes importantes ne sont jamais l'œuvre d'un seul homme, elles sont bien plutôt le résultat des travaux de plusieurs chercheurs ; or, il est en général beaucoup plus facile d'exprimer l'idée d'une vérité quelconque que d'en fournir les preuves suffisantes. Quoique les principes fussent déjà connus, lorsque Pasteur commença ces recherches en 1857, plusieurs points essentiels faisaient encore défaut ; cela se voit surtout dans le fait que Liebig put encore citer les expériences de Stahl, pour expliquer les phénomènes de la fermentation par des transformations purement chimiques. La victoire que Pasteur remporta dans cette controverse, a été le fondement de sa célébrité.

Dans les « *Études sur la bière* », il est clairement et incontestablement démontré *quelle puissance les êtres microscopiques possèdent*, et Pasteur fait ressortir que les *bactéries* peuvent exercer une influence décisive sur la marche de la fermentation alcoolique et sur le caractère de la bière. Les levures y sont également traitées. Pour quelques espèces de ce groupe, qui ne sont décrites qu'avec moins de détails, il est indiqué, comme cela a déjà été fait par Bail et par quelques autres zymotechniciens, qu'elles peuvent agir différemment sur la nature du produit de la fermentation. Ce que Pasteur mentionne ici n'est cependant que la répétition des opinions peu claires de ses devanciers, et *ses indications divergent en deux sens opposés*. Cela apparaît clairement, par exemple, dans ses observations sur la levure dite caséeuse et sur la levure

aérobie. Peut-être est-il question ici d'espèces de levures distinctes, particulières, mais peut-être aussi seulement de formes modifiées par un certain traitement de la levure ordinaire de brasserie. Il ne faut cependant pas oublier qu'il établit son point de vue avec une précision parfaite, et qu'il indique lui-même quelle était la raison pour laquelle la question ne pouvait être élucidée. Cette raison est, *qu'à cette époque, il n'était pas possible de savoir si la levure avec laquelle on opérait se composait, dès l'origine, d'une ou bien de plusieurs espèces; on n'avait pas encore découvert à cette époque de méthode exacte pour la culture pure des espèces de levure, comme il a été dit déjà précédemment* (page 27 et les suivantes). On ne trouve donc pas dans cet ouvrage une *orientation* exacte dans ce monde des microorganismes ; aucun passage de l'exposé de Pasteur ne nous indique, pour les levures, des *caractères* tels que l'on puisse baser sur eux une analyse. Pasteur considère tous les champignons bourgeonnants qui possèdent quelque peu la faculté de provoquer une fermentation alcoolique, comme des *Saccharomyces*; on ne sait jamais au juste s'il s'agit de *véritables Saccharomyces* ou *d'autres champignons bourgeonnants*. Ces levures qui, d'après notre système actuel de classification, se rangent dans des subdivisions très différentes, y sont désignées comme des phases de développement des moisissures semblables au *Dematium*, sans qu'il y ait des preuves à l'appui. Pasteur ne nous dit pas s'il existe ou non plusieurs variétés de ces champignons bourgeonnants (*Saccharomyces, Torula, Dematium*, etc). Sa manière de résoudre les problèmes de botanique que nous venons d'indiquer, doit en somme être considérée comme erronée dans ses points essentiels.

Comme il ressort des explications précédentes, la cause qui empêcha cet ouvrage d'introduire dans la brasserie la réforme annoncée dans la préface, gît avant tout dans l'impossibilité où se trouvait alors la science, d'apporter

de la clarté dans les rapports des différents ferments alcooliques entre eux pendant le procès de la fermentation. Pasteur ne pouvait donc, sur ce point, dépasser les suppositions indéterminées et les opinions contradictoires de ses devanciers. Si dans l'ouvrage mentionné, il donne (page 4-7) un aperçu des microorganismes qui occasionnent des maladies dans la bière, il n'est question, conformément à ce qui a été dit, que de bactéries, et cette opinion est encore partagée, en 1883, par M. Duclaux ainsi que par tous les auteurs français, anglais et allemands. Se basant sur ces études, Pasteur recommande aux brasseurs de recourir à la purification de la levure pour la débarrasser des bactéries, par exemple en la cultivant dans une solution de sucre avec de l'acide tartrique, ou dans du moût avec un peu d'acide phénique (voir plus bas).

Contrairement à ces opinions, Hansen fit connaître en 1883, sa théorie que quelques-unes *des maladies les plus dangereuses et les plus fréquentes de la bière de fermentation basse provenaient, non pas de bactéries, mais de certaines espèces de Saccharomyces*, et que chacun des noms employés par Reess : *Saccharomyces cerevisiæ, Saccharomyces pastorianus, Saccharomyces ellipsoïdeus*, désignaient non-seulement une, mais plusieurs espèces et races distinctes. Hansen démontra que les espèces que l'on avait comprises à tort sous le nom systématique de *Saccharomyces cerevisiæ*, donnaient lieu, dans les brasseries, à des produits de natures différentes. C'est sur cette base que Hansen établit son système, d'après lequel on emploie un levain qui ne se compose que *d'une seule espèce.*

Après quelque opposition, ce système fut reconnu bon et introduit dans la pratique industrielle de tous les pays où l'on fabrique de la bière. Dernièrement, cependant, M. Velten, à Marseille, collaborateur de Pasteur, a attaqué ce système en prétendant que c'était précisément un défaut

de la levure de Hansen, qu'elle ne se compose que d'une seule espèce ou race ; tandis qu'il fait ressortir comme un avantage de la levure de Pasteur, qu'elle se compose, après la purification décrite ci-dessus, non pas d'une seule, mais de plusieurs races de levures de différente nature. Il considère ce mélange de différentes races comme nécessaire, pour que la bière puisse conserver le goût et le bouquet désirables. Il ressort des dernières recherches de Hansen combien cette affirmation est erronée (voir page 30). L'examen expérimental qu'il entreprit montra que le traitement de la masse de levure par l'acide tartrique, d'après la méthode de Pasteur, *favorise le développement des levures de maladie à un tel point que celles-ci prennent finalement le dessus sur la levure de culture proprement dite.* Aussi Pasteur salua-t-il le système de Hansen comme un progrès réel lorsqu'il écrivit : « M. Hansen a, le premier, bien compris que la levure de bière de consommation devait être pure, non-seulement sous le rapport des microbes, ferments et maladies proprement dites, mais qu'elle devait être privée des cellules de levures sauvages » (1).

Non-seulement l'ouvrage de Pasteur conserve-t-il toujours son importance pratique à cause de la puissance avec laquelle l'importance des bactéries pour l'industrie des fermentations y est démontrée, mais il offre également un grand intérêt au point de vue scientifique, particulièrement par la nouvelle *théorie de la fermentation* qui y est développée et qui, avec raison, fit sensation à l'époque.

Contrairement à Brefeld, qui prétendait que la levure ne pouvait pas croître sans oxygène libre, et contrairement à Traube qui, en convenant bien que la levure pou-

(1) *Bulletin de la Société d'Encouragement pour l'Industrie nationale*, janvier 1887, p. 45.

vait se développer sans oxygène libre, soutenait que dans ce cas elle absorbait les albuminoïdes dissous dans le liquide, pour former des cellules, Pasteur établit que les organismes de la fermentation forment une colonie d'êtres vivants dont les fonctions fermentatives sont précisément « une conséquence nécessaire de la vie sans air, de la vie sans oxygène libre ». En outre il établit qu'une fermentation semblable peut se produire aussi dans des solutions sucrées pures. Il maintient que la cause pour laquelle Brefeld ne put parvenir à développer de la levure dans la chambre humide dans une atmosphère d'acide carbonique, était qu'il opérait avec de vieilles cellules de levure, tandis que l'accroissement de la levure sans oxygène libre n'est possible que lorsque les cellules sont très jeunes. La petite quantité d'oxygène libre qui se trouve dans les liquides auxquels la levure est ajoutée « rajeunit les cellules et leur permet de reprendre la faculté de bourgeonner, de poursuivre leur vie et de continuer leur multiplication à l'abri de l'air ».

Pasteur fait donc, comme cela a été dit précédemment, une distinction entre deux espèces d'organismes : les *aérobies* qui ne peuvent vivre sans le contact de l'air, et les *anaérobies* qui peuvent se passer d'air ; ces derniers sont, d'après sa manière d'envisager les choses, « des ferments dans le sens propre du mot ».

Il serait faux d'admettre que la présence d'alcool et d'acide carbonique dans les produits d'une fermentation suppose nécessairement l'influence « d'organismes de fermentation alcoolique proprement dits ». Les expériences faites d'abord par Lechartier et Bellamy, et continuées par Pasteur, ont démontré que lorsque des grains de raisin, des oranges ou d'autres fruits, sur lesquels ne se trouvaient pas de cellules de levure, étaient enfermés dans des vases remplis d'acide carbonique, il se produi-

sait un développement d'acide carbonique et d'alcool. « Le caractère ferment n'est pas une condition de l'existence de la levure. La propriété ferment n'est donc pas inhérente à des cellules d'une nature spéciale. Ce n'est pas une propriété de structure permanente, comme, par exemple, celle d'être acide ou alcalin. C'est une propriété qui dépend de circonstances extérieures et d'un mode de nutrition de l'organisme » (*Études sur la bière*, page 258).

« En résumé, la fermentation est un phénomène très général. *C'est la vie sans air, c'est la vie sans oxygène libre*, ou, plus généralement encore, c'est la conséquence d'un travail chimique accompli au moyen d'une substance fermentescible capable de produire de la chaleur par sa décomposition, travail qui emprunte précisément la chaleur qu'il consomme à une partie de la chaleur que la décomposition de cette substance fermentescible met en liberté. La classe des fermentations proprement dites se trouve restreinte cependant par le petit nombre des substances capables de se décomposer avec production de chaleur et pouvant servir à l'alimentation des êtres inférieurs en dehors de la présence et de l'action de l'air » (*Études sur la bière*, page 261). Ceci est dans son essence la célèbre théorie de la fermentation de Pasteur.

La fermentation d'oxydation, par exemple celle de l'acide acétique, qui demande précisément, comme Pasteur l'a observé lui-même, que l'air soit présent en grande quantité, ne serait donc pas considérée par lui comme une fermentation proprement dite. Que Pasteur ne prenne d'ailleurs pas sa définition au pied de la lettre, cela ressort de ce qu'il fait remarquer lui-même que la propriété fermentative de la levure subsiste également sous l'influence de l'air, quoiqu'à plus faible degré qu'à l'abri de l'oxygène. La justesse de cette assertion dans de certaines

conditions, fut en particulier constatée pour la levure basse, par MM. Pedersen (1878) et Hansen (1879), qui trouvèrent que la quantité de substance sèche dans du moût de bière transformée en alcool, en acide carbonique, etc., par une quantité déterminée de levure, était moins forte lorsque le moût était aéré pendant la fermentation, que lorsqu'il ne l'était pas. Un résultat analogue fut obtenu par M. Ed. Buchner (1885), à la suite de recherches qu'il fit dans ce sens-là avec des bactéries.

Dans ses recherches, Hansen lit en sorte que les cellules renfermées dans le récipient que l'on aérait, tourbillonnassent sans cesse pour être complètement entourées de l'air, qui avait largement accès. Comme elles provoquèrent néanmoins une fermentation alcoolique prononcée, on put donc en conclure avec certitude que celle-ci n'était pas la conséquence nécessaire de la vie sans air.

Dans sa « Théorie de la fermentation » (1879), M. Nägeli démontra que la présence de l'oxygène était même très favorable à la fermentation alcoolique d'une solution sucrée, quand il n'y a pas d'autres substances nutritives à côté du sucre, et que par conséquent la quantité de levure n'augmente pas, ou seulement d'une manière insignifiante. Aussi M. Nägeli dit (page 26): « La théorie de Pasteur, suivant laquelle la fermentation se produirait par suite du manque d'oxygène, ce qui forcerait les cellules de levure à emprunter la quantité nécessaire d'oxygène à la substance en fermentation, se trouve réfutée par tous les faits se rapportant à cette question ».

Cette manière de voir est également partagée par M. A. J. Brown. Celui-ci exécuta une série d'expériences où la fermentation s'effectuait en présence de grandes quantités d'oxygène, tandis que dans des essais parallèles, ce gaz

se trouvait complètement exclu. Dans les deux séries d'expériences, il employa des quantités identiques de cellules de levure, qui se trouvaient dans des conditions telles qu'il leur était impossible de se multiplier. Toutes les autres conditions étaient égales dans les deux séries. Il en résulta — en opposition à la théorie de Pasteur — que dans le premier cas, les cellules offrirent une plus grande activité fermentative, que lorsque l'oxygène était exclu.

Très récemment, M. Hueppe et ses élèves ont en particulier dirigé leurs attaques contre la théorie de la fermentation de Pasteur, et ils ont fourni des exemples d'organismes-ferments « qui, en présence de l'oxygène de l'air, activent les fermentations spécifiques, et cela le plus souvent même mieux ».

Parmi les nombreux travaux de M. Nägeli sur les organismes inférieurs, nous nous bornerons à citer, comme se rattachant à ce qui précède, la théorie « moléculaire-physique » de la fermentation qu'il établit, et qui est en réalité une modification de celle de Liebig. Tandis que Pasteur explique la fermentation comme étant le résultat d'une activité se développant à l'intérieur de la cellule, M. Nägeli la définit comme une transmission des états vibratoires des molécules, des groupes d'atomes et des atomes de différentes combinaisons qui constituent le plasma vivant (combinaisons qui n'éprouvent elles-mêmes aucun changement) sur la substance fermentescible, ce qui a pour effet de détruire l'équilibre dans ses molécules et de les décomposer. Dans la fermentation, les vibrations des molécules du plasma sont transmises de cette manière à la substance fermentescible. La cause de la fermentation se trouve dans le plasma vivant, c'est-à-dire à l'intérieur de la cellule, mais son action s'étend au-delà de celle-ci. *La décomposition du sucre* — principalement en alcool et en acide carbonique — s'opère

moins à l'intérieur, *mais en plus grande partie à l'extérieur des cellules de levure.* Ainsi cette théorie est contraire à celle de Pasteur et se rattache à celles de Stahl et de Liebig (1).

MM. Rayman et Kruis contribuèrent à la biologie des levures par leurs études sur des bières dont la fermentation avait été effectuée pendant plusieurs années avec des cultures absolument pures, préparées d'après la méthode de Hansen. Ils constatèrent comme produit de la fermentation des cultures pures de *Saccharomyces* obtenu à la température usitée dans les brasseries et dans des conditions pratiques normales, un seul alcool, savoir *l'alcool éthylique.* Cet alcool reste pendant des années dans la bière, à côté de la levure vivante, quand on conserve le liquide à basse température à l'abri de l'air. Si, par contre, il se développe au contact de l'air un *voile* de l'espèce de levure employée, il se produit une oxydation active dans laquelle *l'alcool est décomposé en acide carbonique et en eau.* Dans des fermentations de longue durée, les matières albuminoïdes du liquide nourricier sont hydratées à différents degrés par les *Saccharomyces*, qui peuvent également oxyder les produits de l'albumine en acide formique et en acide valérianique. Les auteurs distinguent deux actes dans les fermentations normales,

(1) Dans les nombreux traités mycologiques de Brefeld, les champignons bourgeonnants occupent une place assez remarquable; ainsi ce naturaliste démontra que beaucoup d'Ustilaginées, de Basidiomycètes et d'autres champignons peuvent développer des cellules bourgeonnantes. Des faits semblables avaient d'ailleurs déjà été observés antérieurement par Bail, Reess, Zopf, et par d'autres chercheurs, et comme il n'a pas été prouvé par Brefeld, si ces formes présentaient la formation des spores endogènes caractéristiques pour les *Saccharomyces*, ni si elles pouvaient déployer une activité fermentative marquée, ses assertions peu explicites que ces formes étaient équivalentes aux *Saccharomyces* perdirent leur fondement.

à savoir un acte de décomposition sur le sucre dans le milieu nourricier et un acte de synthèse de l'azote dans le corps des organismes. La fermentation est considérée comme des hydrations et des déshydrations alternatives.

Dans toute la série des différentes théories de la fermentation, le point essentiel de toutes les questions qui s'y rattachent, ne se trouve pas du tout touché : d'où vient-il que dans les cellules microscopiques le *plasma*, qui a le même aspect dans les différentes espèces, provoque néanmoins dans une cellule une fermentation acétique, dans une autre une fermentation butyrique ; qu'il soit capable, dans telle cellule, de faire fermenter directement le sucre de canne, tandis que dans telle autre il ne le peut qu'après une transformation préalable ? La cause de ces activités différentes du plasma est encore un problème à résoudre.

Les théories de la fermentation qui ont été établies jusqu'à présent, ne nous donnent pas une explication sommaire des faits connus, et elles n'ont par conséquent pour nous qu'un intérêt historique.

Comme il ressort de l'exposé précédent, nos connaissances des ferments alcooliques étaient bien défectueuses et vagues lorsque Hansen entreprit ses recherches. Le problème dut donc être étudié à fond par voie expérimentale. C'est ce que Hansen fit dans des travaux soutenus sans relâche pendant nombre d'années.

Les devanciers de Hansen étaient arrivés par les chemins qu'ils suivirent aussi loin qu'il leur était possible d'arriver. Si nous comparons leurs recherches, et en particulier celles de Pasteur et de Reess, à celles de Hansen, nous trouvons que ce dernier savant partit de points de vue nouveaux et de méthodes nouvelles. Il étendit ses investigations dans toutes les directions de ce domaine,

tant en profondeur qu'en étendue. Ses recherches ont pour cela, non-seulement frayé le chemin au point de vue scientifique, mais elles ont encore opéré une réforme dans l'industrie de la fermentation. C'est pourquoi elles formeront avec raison l'objet principal du paragraphe suivant de notre livre.

RECHERCHES DE HANSEN

Lorsque Hansen publia, en 1878, son mémoire sur les organismes dans la bière et dans le moût de bière, il fit ressortir l'incertitude qui régnait dans les travaux sur les *Saccharomyces* proprement dits ; il déclara qu'il n'était pas possible d'avancer dans le chemin poursuivi par ses devanciers, et qu'au contraire, si les recherches devaient faire avancer ce que Pasteur et Reess avaient commencé, *il fallait qu'elles partissent de points de vue tout à fait différents*. Ce n'est que vers la fin de l'année 1881, qu'il réussit à trouver la clef du problème. La tâche qui se présentait en premier lieu était de développer une méthode permettant d'obtenir des végétations qui provinssent chacune *d'une seule cellule*, pour démontrer ensuite par l'expérience, *si les cultures pures ainsi obtenues possédaient des caractères constants* — c'est-à-dire si les *Saccharomyces* se présentaient comme espèce, comme variété, ou comme race — et dans le cas affirmatif, de déterminer en quoi consistaient ces caractères constants. Ce problème une fois résolu, il s'agissait de trouver une méthode pour l'analyse de la levure et d'étudier de différents côtés les conditions vitales de ces organismes.

I. — Préparation de la culture pure.

Nous avons déjà fait voir dans le premier chapitre de ce livre (page 27) que de différents côtés on exprima

l'idée que la condition nécessaire pour arriver à connaître les organismes microscopiques, dont nous trouvons des centaines et des milliers dans chaque gouttelette examinée au microscope, consistait uniquement à isoler la cellule individuelle et à travailler avec une végétation pure provenant de celle-ci. Nous avons en même temps indiqué brièvement les différentes méthodes que l'on avait suivies.

Hansen a démontré à plusieurs reprises dans ses écrits, que *dans tous les cas la seule méthode certaine est de prendre l'individu comme point de départ et d'en suivre le développement dès l'origine*. Il a, dans ce but, élaboré deux méthodes différentes. La première était basée sur des cultures dans des liquides ; la seconde sur des cultures dans des milieux solides, dans les deux cas après une dilution préalable, comme cela a été décrit pages 27-38.

A l'aide des connaissanses acquises des espèces, il fut possible de soumettre ces méthodes à une vérification détaillée, d'où il résulta qu'elles étaient exactes.

S'il s'agit d'isoler d'une végétation formée d'un mélange de différentes espèces, celles qui se trouvent *à l'état affaibli*, il est alors nécessaire, comme Hansen le fait remarquer, d'employer pour la dilution et l'ensemencement un liquide nutritif favorable, par exemple du moût, qui présente à l'organisme en question les conditions de nutrition les plus favorables.

Si par contre, l'autre cas se présente, où l'on désire éliminer d'une végétation mélangée, *l'espèce qui s'y trouve dans un état de développement très vigoureux*, et dont la croissance ne dépend par conséquent pas de conditions de nutrition particulièrement favorables, on peut atteindre le but plus rapidement et avec moins de frais par l'emploi d'un milieu nourricier solide, qui sera dans ce cas de la gélatine et du moût. Il est prouvé qu'une addition

de gélatine à du moût diminuait la valeur de ce dernier comme matière nutritive pour les levures. Ainsi, M. Holm démontra par des séries d'expériences précises, que lorsqu'on introduit des cellules dans du moût gélatinisé, dès le commencement de la fermentation, quand elles sont le plus vigoureuses, environ quatre pour cent des cellules ensemencées ne donneront pas de développement ; si on ensemence par contre la végétation à la fin de la fermentation, quand les cellules sont affaiblies, il y en aura environ vingt-cinq pour cent qui ne donneront pas de colonies.

Cette méthode, telle que Hansen l'a élaborée pour l'étude des champignons bourgeonnants, présente donc l'avantage de pouvoir *observer directement au microscope l'individu, et de suivre son développement ultérieur*, puisque la plaque de gélatine se trouve renfermée dans la chambre humide. (Voir l'exposé précédent des questions se rattachant à ce sujet, pages 36-39.

2. — L'Analyse.

Toute la série des travaux de Hansen est dominée par une idée fondamentale, à savoir que *la forme, la dimension et l'aspect de la cellule ne suffisent pas par elles-mêmes pour établir les caractères d'une espèce*, attendu qu'en raison de différentes conditions extérieures, cette même espèce peut se présenter d'une manière toute différente et avec un caractère entièrement différent. Par contre, les formes de développement de la cellule envisagées à un autre point de vue, peuvent fournir des caractères très importants pour séparer les espèces. Ainsi on trouve, *que les différentes espèces soumises au même traitement se comportent très différemment, soit au point de vue général, soit en particulier à celui de la forme*. Ceci ne peut s'expliquer que par la mise en jeu de propriétés intrinsèques, inhérentes aux cellules individuelles.

Nous donnons ici un aperçu des différentes voies par lesquelles Hansen découvrit les caractères des différentes espèces. Ces recherches contribuent en même temps à la connaissance de la physiologie générale des levures.

a. — *Image microscopique de la levure déposée.*

Le premier examen d'une espèce quelconque de levure consistera ordinairement à observer au microscope *la levure de dépôt*. Pour donner un exemple de ce que l'on peut obtenir par ce moyen, nous renvoyons aux figures suivantes (34, 37, 39, 41, 43, 45), qui représentent les jeunes formes de levure déposée des six espèces de *Saccharomyces* décrites en particulier par Hansen. Ces végétations furent obtenues en transportant les cellules, qui avaient été cultivées pendant quelque temps dans du moût, dans un nouveau moût, où elles arrivèrent à un développement vigoureux au bout de 24 heures à 25-27° C. Si l'on compare par exemple les figures de *Saccharomyces cerevisiæ* aux trois espèces de *pastorianus*, *l'ensemble de l'image nous montrera une différence considérable :* le *Saccharomyces cerevisiæ I* est formé principalement de grandes cellules rondes ou ovales, les *espèces de pastorianus* ont pour la plupart des cellules allongées, en forme de boudin. Mais la chose se présente tout autrement quand on mélange des cellules de la première espèce à des cellules d'une des autres espèces mentionnées. Il n'est alors pas possible, si l'on ne se base que sur l'observation des formes, de distinguer les grandes et les petites cellules ovales ou rondes de l'espèce *pastorianus*, de beaucoup de cellules du *Saccharomyces cerevisiæ I*. Les deux espèces *Saccharomyces ellipsoïdeus I et II* sont formées essentiellement de cellules ovales et rondes ; il se présente cependant aussi des cellules allongées, de sorte qu'il n'est non

plus possible dans ce cas, d'obtenir une distinction des espèces par l'observation des formes, quand elles se trouvent mêlées au *Saccharomyces cerevisiæ I* ou au *Saccharomyces pastorianus*.

Des mesures directes exécutées sur ces formes de levure de dépôt ne nous fourniront non plus de points d'appui.

Un examen de ces six groupes de figures de cultures pures montre qu'on est en présence de *trois différentes classes de levure;* dont l'une est représentée par le *Saccharomyces cerevisiæ I*, tandis que la seconde comprend les trois espèces *pastorianus*, la troisième les deux espèces *ellipsoïdeus*. Voilà *absolument tout* ce que l'examen purement microscopique nous permet de reconnaître, et il faut encore remarquer que cela ne se peut que dans les conditions de culture indiquées.

b. — *La formation des ascospores.*

Les recherches de Hansen sur la formation de spores endogènes qui a lieu à l'intérieur des cellules des *Saccharomyces*, ont été le premier fondement d'une *méthode analytique* pour les levures. Nous donnons ici un aperçu de la méthode expérimentale et des résultats obtenus en général.

La sporulation dans les cellules de levure a été étudiée par plusieurs savants (p. 129-131). De toutes ces recherches en partie contradictoires, il ne résulta que ceci de certain : c'est que *la cellule des Saccharomyces pouvait, dans de certaines conditions restées inconnues, former des spores à son intérieur.*

A la suite de nombreuses expériences, Hansen réussit à établir les *lois suivantes pour la sporulation des Saccharomyces :*

1° L'air atmosphérique doit avoir abondamment accès

aux cellules, qui doivent être semées sur une surface humide :

2° Il n'y a que les cellules jeunes et vigoureuses qui peuvent remplir les fonctions de la sporulation.

3° La température la plus propice se trouve pour la plupart des espèces examinées jusqu'à présent aux environs de 25° C. Cette température est favorable à la sporulation des espèces connues jusqu'à présent.

4° Quelques *Saccharomyces* forment des spores même lorsqu'ils se trouvent dans des solutions nourricières en fermentation.

La levure se développe comme cela est indiqué page 145. On en porte de petites quantités sur de petits blocs de plâtre préalablement stérilisés. Ces petits blocs sont placés dans de petites cuvettes plates en verre avec couvercle, et on les maintient humides en remplissant les cuvettes à moitié d'eau (1). Si l'on a seulement pour but de provoquer en général la formation mentionnée, on peut laisser les appareils à la température ordinaire des chambres.

Une description exacte de la *structure des spores* et un exposé détaillé de leur *développement*, fondé sur des *observations sur l'individu*, a, pour la première fois, été donné par Hansen. Sous ce rapport, il indique *trois groupes de Saccharomyces avec des caractères typiques distincts*, qui diffèrent les uns des autres dans le mode de germination ou dans la forme des spores.

(1) On peut aussi produire les ascospores en portant la levure sur de la gélatine stérilisée et solidifiée avec ou sans liquide nourricier dans un endroit humide; de même dans de l'eau de levure ou de l'eau stérilisée. Enfin dans les formations de voiles des *Saccharomyces* il peut aussi se présenter des cellules développant des spores. — Il va sans dire que la méthode n'est pas donnée par les différents milieux nourriciers, mais uniquement par la connaissance des éléments qui, en général, permettent aux cellules l'accomplissement de cette fonction.

Au bout d'un certain temps, variant avec les espèces, il se forme à l'intérieur de la cellule des corpuscules de plasma arrondis, qui sont les *rudiments des spores* (Fig 26). Après cette première phase de développement, elles s'entourent d'une *paroi* qui, chez les différentes espèces, *apparaît plus ou moins distinctement.*

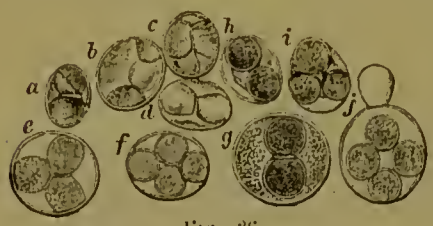

Fig. 26.

Les premières phases de développement des spores du *Sacch. cerevisiæ I* d'après Hansen. **a, b, c, d, e** rudiments des spores, la paroi n'est pas encore distincte; **f, g, h, i, j** spores complètement développées avec parois distinctes.

Dans le *premier type*, qui comprend le *Saccharomyces cerevisiæ I*, les spores peuvent, dès les premières phases de la germination, se gonfler si fortement qu'il en résulte, par la pression qu'elles exercent l'une sur l'autre pendant qu'elles se trouvent encore dans la cellule-mère, ce que l'on appelle des cloisons (Fig. 27). Ceci fait qu'une quantité plus ou moins considérable de plasma reste serrée en forme de coins ou de plaques entre les spores, ou bien que les parois des spores entrent elles-mêmes en contact intime les unes avec les autres. Pendant le développement ultérieur, il peut se produire une fusion complète entre les parois, ce qui constitue une *véritable for-*

Fig. 27.

Spores du *Saccharomyces cerevisiæ I* commençant à germer, d'après *Hansen*. **a, d, e** et **g** montre la formation des cloisons. Dans **e, f** et **g**, les parois de la cellule-mère sont rompues. **g** nous montre un corps de spores divisé en plusieurs loges, dont la paroi est rompue en trois endroits.

mation de cloisons ; la cellule est alors devenue un corps de spores à plusieurs loges.

Pendant la *germination* (Fig. 28) les spores se gonflent, et la paroi de la cellule-mère, qui était primitivement passablement épaisse et élastique, s'étend, de sorte qu'elle

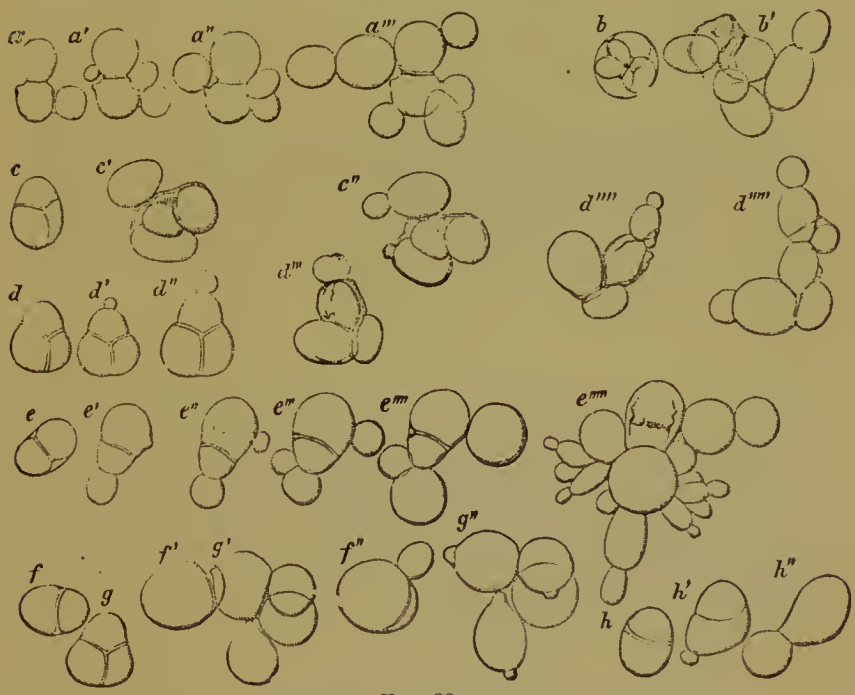

FIG. 28.

Bourgeonnements des spores chez le *Saccharomyces cerevisiæ I* d'après Hansen. **a** Trois spores sans la paroi de la cellule-mère ; **b** cellule avec quatre spores, dans **b'** la paroi de la cellule-mère est rompue ; **c** cellule avec quatre spores, dont trois sont visibles, dans **c'** et **c''** on voit la paroi rompue de la cellule-mère ; **d** cellule avec trois spores, dans **d'''** la paroi rompue de la cellule-mère ; **e-e'''''** développement d'une très forte colonie ; **f-h** autres formes de développement, dans **h''** la paroi entre les deux spores a disparu.

devient plus mince et plus fine. Finalement elle se rompt et reste à l'état de voile plissé ou froncé qui enveloppe les spores en partie, — ou bien elle est peu à peu absorbée pendant la germination.

En chaque point de la surface de la spore gonflée il peut

pousser un bourgeon. Ce bourgeonnement a lieu ordinairement après la rupture ou l'absorption de la cellule-mère, il peut cependant exceptionnellement se produire à l'in-

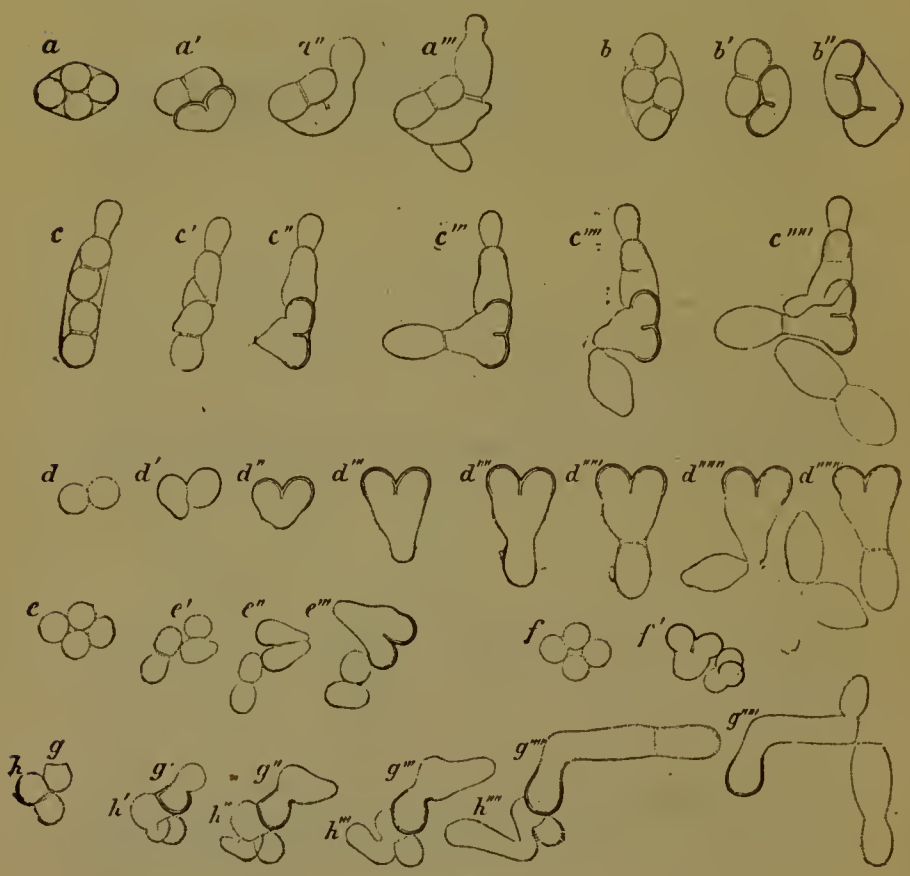

Fig. 29.

Bourgeonnement des spores chez le *Saccharomyces Ludwigii*, d'après Hansen. **a-c** proviennent d'une culture sur blocs de plâtre âgée de 12 jours, **d-h** d'une même culture datant de 1 1/2 mois.

térieur même de la cellule-mère. Après la formation des bourgeons, les spores peuvent rester unies, ou bien se séparer rapidement.

Il y a des spores qui manifestent un caractère particu-

lièrement remarquable (voir Fig. 28 *e-e''''* et *h-h''*). Ici la paroi séparant deux spores contiguës est dissoute, de sorte que celles-ci *se fondent en une seule spore*. Hansen croit que l'importance biologique de ce phénomène consiste dans le fait que les spores sont par là mieux à même de bourgeonner dans des circonstances difficiles, que lorsqu'elles sont séparées. Une spore joue donc, dans ce cas, vis-à-vis de l'autre, le rôle d'un parasite. Nous avons peut-être un commencement de cette fusion dans le corps de spores à plusieurs loges mentionné plus haut.

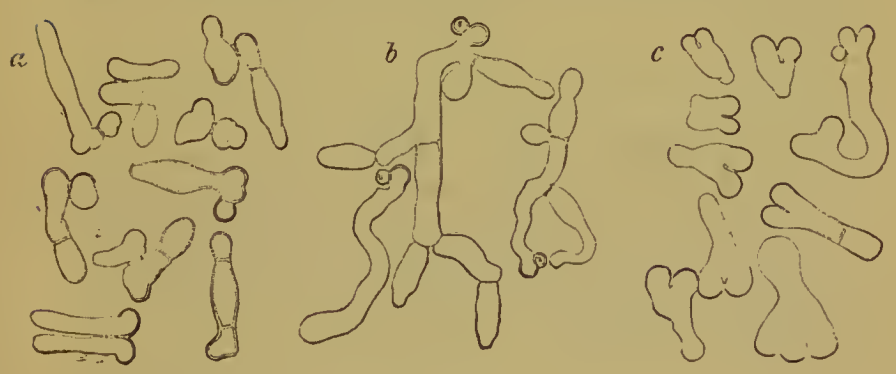

Fig. 30.

Saccharomyces Ludwigii, d'après Hansen.

Spores en germination provenant de vieilles cultures sur blocs de plâtre. **a** et **b** nous montrent des groupes de spores dont chacune développe son tube germinatif particulier; dans **c** on voit différentes formes de fusion.

Dans les espèces des groupes *Saccharomyces pastorianus* et *Saccharomyces ellipsoïdeus* que Hansen a examinées à ce point de vue, la germination se fait essentiellement de la même manière que pour le *Saccharomyces cerevisiæ I*.

Un *second type* tout différent se présente avec le *Saccharomyces Ludwigii* (Fig. 29), *où la fusion se produit dès les toutes premières phases de la germination*. Ce sont ici les *formations nouvelles* et non les spores qui s'unissent.

Ces formations nouvelles se distinguent encore du type précédent en ce qu'elles ne sont pas des cellules de levure mais des *formations mycéliennes,* un *promycelium.* De ce *promycelium* part le développement des cellules de levure, qui sont délimitées *par une paroi transversale bien marquée,* après quoi ces cellules se séparent et ne s'arrondissent que plus tard. Ces cellules de levure produisent à leurs extrêmités des bourgeons qui sont également délimités par des parois tranversales.

Les vieilles spores ne présentent ces fusions particulières que plus rarement (Fig. 30). Quelques tubes germinatifs (groupe *b*) se développent pour former un *mycelium* ramifié.

Le *troisième type,* que représente le *Saccharomyces anomalus* (Fig. 31, voir aussi cette espèce), se distingue surtout des précédents par ce qu'il possède des spores d'une *forme toute différente* de celle des autres espèces, et qui ressemblent aux spores de l'*Endomyces decipiens* (1) Elles forment à peu près un hémisphère avec un filet saillant partant de la base.

Fig. 31.

Germination des spores du *Saccharomyces anomalus,* d'après Hansen.

Pendant la germination de la spore, celle-ci se gonfle et le filet saillant peut rester ou disparaître. Il pousse alors

(1) Un champignon qui vit en parasite sur les lamelles de certains agarics.

de différents points de la surface de la spore des bourgeons qui s'en séparent.

Dans les expériences de Hansen, il s'agissait aussi de déterminer quelle influence les différentes *températures* exerçaient sur la sporulation, pour savoir si les espèces se comportaient de la même façon, ou s'il était possible de découvrir ainsi des caractères différents. Il fallut déterminer : 1° Les *températures limites*, c'est-à-dire la plus haute et la plus basse température permettant encore le développement des spores ; 2° la *température optima*, c'est-à-dire celle où les spores apparaissent le plus rapidement ; et enfin, 3° l'état des températures se trouvant entre les limites extrêmes.

Pour déterminer le temps nécessaire aux cellules pour procréer des spores, on choisit le moment *où les cellules présentent les signes distincts de spores naissantes* (Voir Fig. 26 et 32). Il n'est pas possible de se servir pour cette observation de la spore mûre, car il n'existe pas de critérium de la maturité complète.

Les résultats obtenus par Hansen sont les suivants :

La sporulation se produit lentement à basse température, mais plus rapidement à mesure que la température s'élève jusqu'à un certain point ; dès qu'on dépasse ce point optimum, le développement devient de plus en plus lent jusqu'à ce que finalement il cesse complètement.

Les limites les plus basses de la température de la sporulation furent trouvées, pour les six espèces décrites en premier lieu, entre 0,5-3° C., celles de la température la plus élevée à 37 1/2° C. On trouva pour ces six espèces, pour lesquelles Hansen détermina également la relation de la température au temps entre ces deux limites extrêmes, que lorsque ces deux quantités étaient représentées graphiquement, de manière à prendre les degrés de température comme abscisses et les temps comme ordonnées, il en résultait des courbes

qui avaient essentiellement les mêmes formes pour toutes les six espèces. Ces courbes s'abaissent à partir de l'ordonnée du degré de température le plus bas vers l'axe des abscisses dont elles s'éloignent ensuite de nouveau. En même temps, il résulte de ces courbes, *que ce sont principalement les points cardinaux déterminés par la température la plus élevée et la plus basse qui nous donnent les caractères distinctifs des espèces, c'est-à-dire que les limites de la température, entre lesquelles la sporulation peut avoir lieu pour les différentes espèces, sont différentes* (Voir la description des six espèces.

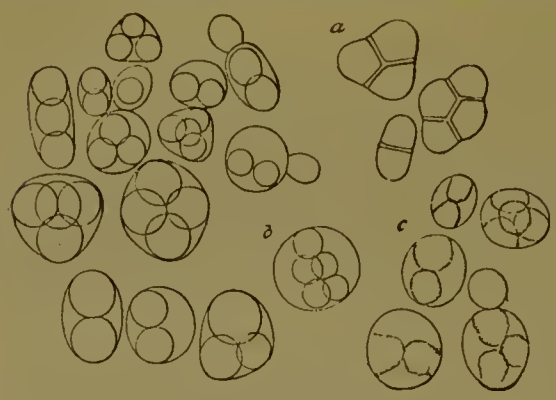

Fig. 32,1

Saccharomyces avec *ascopores*, d'après Hansen.

1. *Saccharomyces cerevisiæ* I, **2.** *Saccharomyces pastorianus* I, **3.** *Sacch. pastorianus* II, **4.** *Sacch. pastorianus* III, **5.** *Sacch. ellipsoideus* I, **6.** *Sacch. ellipsoideus* II, **a** Cellules avec formations de cloisons, **b** Cellules avec une quantité de spores supérieure à la normale, **c** cellules avec spores naissantes très distinctes.

Fig. 32,2

En ce qui concerne le temps nécessaire à la formation des spores dans *les six espèces examinées* aux mêmes conditions de température,

on remarquera ce qui suit : à la température maximum le développement demande, chez toutes les espèces, environ trente heures avant de se produire ; à 25° C., on ne

Fig. 32,[3]

trouve également pas de très grandes différences de temps ; mais à des températures inférieures, *les différences sont frappantes*. Ainsi par exemple, le *Saccharomyces cerevisiæ* I ne développe ses spores à 11 1/2° C., qu'au bout de 10 jours ; le *Saccharomyces pastorianus* II au bout de 77 heures, etc.

Fig. 32,[4]

Dans toutes les déterminations de ce genre, *l'état des cellules a une très grande importance* suivant que celles-ci se sont développées à haute ou à basse température, suivant qu'elles étaient vieilles ou jeunes, faibles ou vigoureuses, etc. Il s'ensuit que la composition du liquide nourricier exerce aussi son influence. Une condition nécessaire par conséquent dans des recherches méthodiques et comparées de ce genre est, que les cellules soient toujours préalablement cultivées

de la même manière. Dès que l'on varie ces conditions extérieures, il faut en même temps déterminer d'une manière correspondante les limites pour les réactions des espèces.

Ces expériences de Hansen nous ont fourni un caractère important pour la détermination des espèces de *Saccharomyces*.

Fig. 32, 5

Le même savant trouva un nouveau caractère distinctif des espèces dans *la différente structure anatomique des spores*. Dans l'analyse complète d'une espèce de *Saccharomyces* on doit donc nécessairement tenir compte de ces deux caractères, ainsi que de ceux qui seront indiqués dans la suite (formation des voiles, etc.).

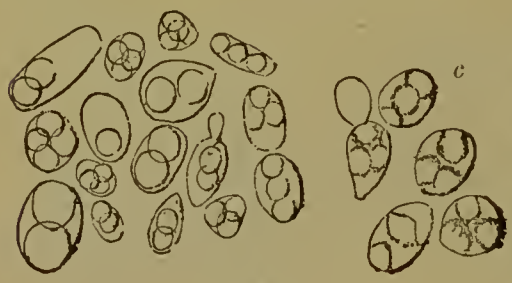

Fig. 32, 6

C'est sur certaines observations faites sur les courbes de la température de la sporulation et sur la structure des spores que Hansen a basé *la méthode d'analyse de la levure basse de brasserie au point de vue pratique*, mentionnée ci-dessous. Il observa que les espèces employées dans l'industrie, celles que l'on nomme *levures de culture*, développent leurs spores à certaines températures *plus tard* que les espèces dites *levures sauvages*, dont un grand nombre sont connues dans l'industrie comme levures de maladie. Outre cela, il trouva que *la*

structure de la spore diffère ordinairement dans ces deux groupes : la jeune spore de la levure de culture offre une paroi (membrane) distincte et le contenu en est irrégulier, granuleux et muni de vacuoles ; dans la cellule de levure sauvage au contraire, la jeune spore présente le plus souvent une paroi indistincte et un contenu plus réfringent et plus homogène. Il faut encore ajouter que dans les levures de culture, les spores sont ordinairement plus grandes que dans les levures sauvages.

1° Pour *contrôler pratiquement* d'une manière suivie et quotidienne *la levure*, on se sert, en égard à l'infection par la levure sauvage, du procédé suivant, qui est très commode. *A la fin de la fermentation principale*, on prend dans la cuve avec un flacon stérilisé un petit échantillon du liquide en fermentation, on laisse reposer le flacon pendant quelques heures, jusqu'à ce que la levure se soit déposée au fond, et ensuite on transporte cette levure sur un des *blocs de plâtre* qui ont été décrits page 147. La culture se place dans un thermostat à 25° C. ou à 15° C.

On trouve, comme cela a été confirmé par les expériences détaillées de MM. Holm et Poulsen, que les races de levure de culture employées dans les brasseries de fermentation basse peuvent être divisées en deux groupes : à 25° C. *un groupe* développera ses spores plus tard que la levure sauvage ; *l'autre groupe*, par contre, formera à cette même température ses spores à peu près en même temps que la levure sauvage, tandis qu'à 15° C. les cellules de la levure sauvage formeront leurs spores beaucoup plus tôt que les cellules de ces levures de culture.

On examine les cultures à 25° C. au bout de 40 heures, celles à 15° C, après trois jours.

La levure haute des brasseries peut, d'après nos recherches personnelles, être analysée à peu près de la même manière.

Des expériences exécutées par MM. Holm et Poulsen dans le but de déterminer jusqu'à quel point la méthode analytique de Hansen pouvait suffire pour les recherches, telles qu'on les effectue en pratique, eurent pour résultat *qu'on arrivait ainsi à déceler avec certitude même une très petite addition de levure sauvage, environ 1/200 de la masse entière de la levure (levure basse de Carlsberg n° 1)*. Hansen a démontré par des expériences antérieures que quand, par exemple, les deux espèces *Saccharomyces pastorianus III* et *Saccharomyces ellipsoideus II*, qui toutes deux peuvent provoquer des troubles de levure dans la bière, étaient mélangées au levain dans la proportion de seulement 1/41, la maladie *ne pouvait pas* se produire, en supposant que la fermentation et la conservation se fassent d'une manière normale. En outre, il a prouvé que le *Saccharomyces pastorianus I*, qui donne à la bière une odeur désagréable et un goût amer, n'était pour ainsi dire plus capable de produire cette action nuisible, toutes choses égales d'ailleurs, si l'addition de cette levure au levain comportait moins de 1/22. Par conséquent, une analyse basée sur la sporulation, suivant la méthode de Hansen, pourra fournir des renseignements suffisants.

Cette méthode présente en outre l'avantage que *l'analyse peut être exécutée avec des mélanges tels qu'en offre le levain de brasserie, et cela en peu de temps.*

Si l'analyse a pour but de faire distinguer plus exactement les différentes espèces contenues dans l'échantillon, on isole par ensemencement fractionné une série de cellules, et les cultures qui s'en développent s'examinent isolément.

Un examen de la levure basse pendant les différentes phases de la fermentation principale montre, comme Hansen l'avait déjà indiqué en 1883, que ce n'est que dans les dernières phases de la fermentation principale que les espèces de levures sauvages apparaissent ordinaire-

ment dans les couches supérieures du liquide, en nombre plus considérable. *Les échantillons du liquide qu'on sort de la cuve pour l'analyse de la levure doivent donc*, comme il est dit plus haut, *être pris dans les derniers jours de la fermentation.* S'il se passe un certain temps avant que la levure puisse être analysée, il faut toujours l'introduire préalablement dans du moût et lui faire faire une ou plusieurs fermentations, peu importe qu'elle se trouve à l'état sec ou humide [1].

Il va de soi que l'analyse de la levure, quelque précieuse qu'elle soit, ne conserve jamais qu'une importance secondaire dans l'industrie; l'article le plus important du système sera toujours, en tous cas, l'emploi de la race de levure choisie et cultivée à l'état pur.

2° L'analyse de *la levure dans l'appareil propagateur*, où *elle doit se trouver absolument pure*, s'effectue de la manière suivante: à la fin de la fermentation on sort avec précaution des échantillons avec des ballons Pasteur ou avec des flacons de Hansen, dont on se sert pour l'expé-

(1) L'observation faite sur de la levure basse, mentionnée ci-dessus, a été confirmée par M. J. Vuylsteke. Il produisit des fermentations de mélanges de différents *Saccharomyces* dans des vases de verre cylindriques contenant chacun environ 2 litres et il détermina par des numérations et des cultures les rapports des différentes espèces entre elles. Pour des mélanges de *levures hautes* et d'espèces sauvages, la règle mentionnée n'est, suivant les expériences faites aujourd'hui par M. J. Vuylsteke, pas applicable d'une manière générale. Ainsi, dans quelques essais faits avec des mélanges de *Saccharomyces cerevisiæ I* Hansen et de *Saccharomyces pastorianus I* Hansen, on observa une augmentation, dans d'autres essais une diminution des levures sauvages vers la fin de la fermentation principale. Par contre, toutes les expériences faites avec des mélanges de *Saccharomyces cerevisiæ I* et de *Saccharomyces pastorianus III* montrèrent que l'infection dans les couches supérieures du liquide était plus forte à la fin de la fermentation qu'au début, c'est-à-dire comme c'est le cas dans la fermentation basse.

dition de la levure et qui ont été décrits page 25; on introduit des parcelles de ces échantillons dans le ballon avec de l'eau de levure et l'on soumet celui-ci à la température d'environ 25° C. pour l'examen bactériologique de la levure. On laisse le reste en repos pour que la levure se dépose, puis on décante la bière et l'on introduit des échantillons du dépôt pris au hasard dans une solution de sucre acidulée avec de l'acide tartrique. Après trois ou quatre cultures dans une pareille solution, on introduit la levure plusieurs fois dans du moût de bière, puis on observe la sporulation. Les plus légères traces de levures sauvages dans l'appareil obtiennent par ce traitement (page 31) un fort développement.

c. — *La formation des voiles.*

En observant la formation des voiles des *Saccharomyces*, Hansen a trouvé, par une tout autre voie que dans le cas qui vient d'être mentionné, des signes caractéristiques pour les différentes espèces. Cela ouvrit encore un chemin tout nouveau à l'étude de ces champignons, car les indications qui nous ont été fournies jusqu'à présent sur ce sujet s'écartaient absolument de la vraie nature biologique.

Un phénomène bien connu est que *des liquides fermentés se couvrent d'un voile*. On sait que ce furent principalement les voiles formés par des champignons bourgeonnants — *Mycoderma cerevisiæ*, *Mycoderma vini* — qui attirèrent l'attention, et la fréquence avec laquelle on fit mention de ces voiles dans la littérature eut un effet qui retrouve son pareil dans d'autres domaines : on a discuté sur ces voiles comme sur un sujet connu, de sorte qu'on a fini par croire qu'on le connaissait véritablement. Maintenant que Hansen a soumis la question à un examen expérimental, on s'aperçoit qu'on était dans l'erreur

Hansen a étudié un grand nombre de voiles, entre autres certaines formes qui se rapprochent le plus de plusieurs espèces de « *Saccharomyces mycoderma* » qui ne forment pas de spores endogènes. Suivant de Seynes, Reess et Cienkowski, ces espèces de Mycoderma formeraient des ascospores ; il est cependant très probable que ces observateurs avaient sous les yeux des voiles impurs entremêlés de véritables *Saccharomyces*. La détermination du degré de pureté d'une telle culture ne présente pas peu de difficultés, quand on ne prend pas comme point de départ une cellule *unique ;* car lorsque le *Mycoderma cerevisiæ* fut cultivé comme levure de dépôt, les cellules prirent un tout autre aspect. Elles contenaient plus de plasma, tandis que les cellules des voiles sont, comme on sait, pauvres en plasma, avec des vacuoles fortement développées. Ces formes, que l'on considère ordinairement comme appartenant au *Mycoderma cerevisiæ*, développent facilement et rapidement des voiles, quelques-unes manifestent en même temps des phénomènes fermentatifs visibles, d'autres n'en manifestent point. Sur la bière et le moût, ces voiles sont grisâtres, secs, plus tard ils prennent des plis et affectent une couleur plus claire: il y a beaucoup d'air qui se trouve emprisonné entre les cellules. Quelques-unes des *formes de Torula* examinées par Hansen, forment des voiles semblables ; par contre, le voile formé par la *Chalara mycoderma* est visqueux, dur et un peu brillant. La formation des voiles de *monilia*, qui, comme cela a été dit précédemment, peut se présenter avec des cellules bourgeonnantes et peut faire fermenter directement la saccharose, est particulière : déjà pendant la fermentation vigoureuse, il se forme sur les bulles d'acide carbonique un voile, qui s'étend ensuite sur toute la surface en formant parfois des plis. Dans le ballon, les cellules tombent donc d'abord comme levure de dépôt, provoquent une fermentation

active et remontent enfin avec les bulles d'acide carbonique à la surface, où elles entrent dans une nouvelle phase de développement. Si de la bière de garde stérilisée est infectée par ce champignon, il ne se manifeste aucune fermentation, et il apparaît seulement un voile mince semblable à de la poussière. Soumis à d'autres conditions, le champignon forme une couche d'un blanc de farine et cotonneuse comme l'oïdium.

Chez les Saccharomyces proprement dits, il se forme également des voiles, mais quelque peu différents de ceux qui ont été mentionnés plus haut. Tel est le cas pour quelques-uns des Torulas de Pasteur et pour le « Saccharomyces apiculatus ». D'après cette observation, la formation des voiles ne doit pas être envisagée comme un phénomène propre à certaines espèces, mais bien *comme un phénomène qui se produit pour tous les microorganismes en général*.

Dans les *espèces de Saccharomyces*, cette formation se présente généralement de la manière suivante : lorsqu'on expose sans les déranger des cultures dans du moût pendant un temps plus ou moins long à la température ordinaire des appartements, il apparaît à la fin de la fermentation principale, peu à peu, à la surface du liquide, de petites taches de levure ; celles-ci peuvent plus tard se rassembler pour former des figures d'aspect et de grandeur différentes, ou des ilôts, dont la partie supérieure est plane et la partie inférieure convexe. Finalement, ces taches se réunissent et constituent un voile continu, gris-jaune, mucilagineux, qui peut se propager jusqu'aux parois du verre et y former un anneau entier. Une formation de voiles aussi complète ne peut avoir lieu que lorsque la fermentation principale est terminée. Si l'on secoue le ballon, des fragments isolés du voile se détachent, *tombent au fond*, et de cette manière il peut se former peu à peu tout un dépôt, pendant que le voile se renouvelle. Ce

dernier prend un aspect marbré, vu que les parties plus jeunes sont minces et foncées, les anciennes au contraire épaisses et claires.

La condition essentielle pour que le voile puisse se former est que la *surface soit pure et immobile*, en contact direct avec l'atmosphère ; une formation vigoureuse de voiles suppose d'ailleurs une affluence abondante de l'air. Il résulte de ceci que, dans les ballons Chamberland ou dans des ballons ordinaires recouverts de papier à filtrer, le développement est beaucoup plus rapide et plus fort que dans le ballon Pasteur, où l'accès de l'air est limité. La fonction de la formation des voiles est donc soumise dans ce sens aux mêmes conditions que la formation endosporée.

Simultanément avec la formation des voiles, il se produit une décoloration du moût, qui devient jaune clair. Cette réaction apparaît le plus rapidement à des températures élevées, et de la manière la plus frappante chez les espèces qui produisent la plus vigoureuse formation de voiles.

La culture préliminaire des cellules est la même que celle qui a été décrite précédement (p. 145). On décante le liquide de la végétation développée et on y ajoute du nouveau moût stérilisé. On transporte — avec les mesures de précaution d'usage — une goutte du mélange de levure et de moût secoué préalablement dans des ballons d'une capacité d'environ 150 centimètres cubes remplis à moitié de moût et coiffés de papier à filtrer. Hansen exposa ces ballons à différentes températures et il détermina :

1. Les limites de la température pour la formation des voiles.

2. Le moment de leur apparition à différentes températures.

3. L'aspect microscopique des végétations à ces différentes températures.

Le point capital dans ces études sur les six espèces

mentionnées précédemment, est *l'aspect microscopique de leurs voiles à températures égales,* et nous obtenons ici de nouveau, à un point de vue différent de celui dont nous sommes partis précédemment, un examen complet de la relation qui existe entre les facteurs actifs et les formes, examen qui nous montre que nous sommes en présence d'autant de types ou d'espèces différentes par leur nature intérieure.

L'examen du voile a lieu, à moins d'indication contraire, lorsqu'il est assez développé pour pouvoir être déjà vu à l'œil nu.

En considérant les figures représentant ces végétations de voiles (voir pages 187 et les suivantes) on reconnaît aussitôt que le caractère général des végétations de voiles est ordinairement tout différent de celui de la levure déposée. Ainsi la forme du dépôt est pour le *Sacch. cerevisiæ I* ovoïde ou sphérique, mais dans les voiles apparaissent bientôt des cellules allongées, et peu à peu la végétation prend un aspect qui diffère complètement de celui de la levure déposée.

Si nous comparons ensuite les formes de voiles des six espèces, nous trouvons que les voiles développés à des températures élevées ne sont que d'un faible secours dans l'examen, car il n'y a ici que le *Saccharomyces cerevisiæ I* et le *Saccharomyces ellipsoideus II* qui se distinguent des autres espèces. Il en est cependant tout autrement quand on observe *les jeunes voiles à 13-15° C.* Les deux espèces *Saccharomyces pastorianus II* et *Saccharomyces pastorianus III*, qui toutes deux sont des levures de fermentation haute, et dont les cellules en culture ordinaire ne peuvent, avec certitude, être distinguées l'une de l'autre, apparaissent ici avec des végétations toutes différentes. On trouve une différence tout aussi frappante entre les espèces *Saccharomyces ellipsoideus I* et *II.*, qui autrement se ressemblent.

Il résulte de l'observation des *limites de température* pour la formation des voiles que pour le *Saccharomyces cerevisiæ I* et le *Saccharomyces ellipsoideus I*, elle s'arrête à environ 38° et à 5 ou 6° C. ; pour les trois espèces du groupe pastorianus, les limites se trouvent entre 34° et 3° C.; le *Saccharomyces ellipsoideus II* a la même limite inférieure que ces dernières, la température maximum se trouve par contre à 38-40° C.

Les limites de temps, comparées à celles indiquées précédemment pour la sporulation, nous montrent que dans les deux cas le développement est beaucoup plus lent à basse température qu'à des températures élevées ; aux températures voisines des maxima et des minima, la formation des voiles est toujours très faible et incomplète.

Aux températures supérieures à 13° C., *le voile du Saccharomyces ellipsoideus II a un développement si rapide et si vigoureux*, que par ce seul fait on peut reconnaître les flacons renfermant cette espèce. Ainsi à 22-23° C., cette espèce forme un voile qui recouvre complètement la surface du liquide au bout de 6 à 12 jours, tandis que les cinq autres espèces exigent le triple de temps pour ne former qu'un voile, qui, la plupart du temps, n'est que moins bien développé. Cette espèce et *Saccharomyces pastorianus III* donnent aussi à la température ordinaire d'une chambre, assez rapidement, un voile prononcé, tandis que les autres espèces sont, au bout du même temps, encore bien en retard.

Comme il est dit plus haut, les formations des voiles ont des températures maxima différentes. Ceci est en connexion avec le fait, *que la température maximum pour le bourgeonnement n'est pas la même pour les différentes espèces.* Il a été démontré *que le bourgeonnement et la fermentation peuvent avoir lieu à des tem-*

pératures où il n'existe plus de formation de voiles. Ainsi Hansen observa encore à 38-40° C. une fermentation et un bourgeonnement vigoureux avec les *Saccharomyces cerevisiæ I*, *Saccharomyces ellipsoideus I*, et *Saccharomyces ellipsoideus II*, à 34° C. avec les trois espèces du groupe *Saccharomyces pastorianus*. Il existe donc une relation entre l'influence que la température exerce sur le bourgeonnement et la fermentation d'une part, et d'autre part celle qu'elle a sur la formation des voiles.

d. — *Les limites des températures pour les espèces de Saccharomyces.*

De même que les températures jouent des rôles inégaux dans le développement des spores et des voiles des différentes espèces, de même aussi les expériences de Hansen (1883) ont prouvé que les spores ainsi que les cellules végétatives avaient, dans les différentes espèces, des forces de résistance inégales contre l'échauffement dans l'eau. Les spores sont, sous ce rapport, plus résistantes que les cellules végétatives.

Pour des déterminations de ce genre, l'état des cellules a, comme dans les cas mentionnés précédemment, une très grande influence. Le résultat dépend, en particulier, beaucoup de l'âge des cellules et varie selon qu'on opère sur de vieilles ou sur de jeunes cellules. Ainsi on observa que les cellules du *Sacch. ellipsoideus II*, prises d'une culture dans du moût de deux jours à 27° C, étaient détruites au bout de 5 minutes en les soumettant à 56° C. de chaleur dans de l'eau distillée stérilisée, tandis que des cellules d'une même culture, mais âgée de deux mois et demi, résistaient pendant 5 minutes à une température de 60° C.

Des spores mûres de cette espèce, développées à 17-18° C. et séchées en partie pendant huit jours à la même

température, supportèrent un chauffage à 62° C. prolongé pendant cinq minutes, mais non à 66° C.

Les cellules végétatives du *Sacch. cerevisiæ I*, dans de semblables conditions, périssent en cinq minutes, lorsquelles sont soumises à l'influence d'une température de 54° C., tandis que les spores ne sont tuées qu'à 62° C.

Un groupement intéressant des six espèces de Hansen (page 189 et les suivantes) d'après une température déterminée, se présente également, lorsqu'elles sont cultivées dans du moût, dans des conditions favorables à la formation des voiles (page 163). Quand le développement a lieu à 36-38° C., les trois espèces pastorianus sont tuées au bout de 11 jours, tandis que le *Sacch. cerevisiæ I* et les deux espèces ellipsoïdes sont encore en vie. On peut, entre autres, en conclure que la règle établie auparavant, suivant laquelle les levures de fermentation haute peuvent se développer à une température plus élevée que les levures de fermentation basse, est inexacte.

Les recherches entreprises plus tard par M. Kayser, dans quelques-unes des directions mentionnées plus haut, confirment les résultats indiqués. On trouva aussi qu'à l'état sec les espèces supportent des températures beaucoup plus élevées qu'à l'état humide. Ainsi une espèce de levure de « pale-ale » fut tuée à l'état humide après avoir été soumise pendant cinq minutes à l'action d'une température de 60-65° C., tandis qu'elle supporta à l'état sec une température de 95-105° C. ; pour une levure de vin (St-Émilion) la proportion fut de 55-60° C. et de 105-110° C. Pour les spores, la force de résistance augmentait encore de 10-20° C.

Les cellules végétatives dérivées des spores chauffées présentèrent une force de résistance un peu plus grande que celle des cellules végétatives normales. Mais ce surcroît de force de résistance ne se transmit pas à la des-

cendance ; en cultivant dans du moût de bière, il disparut déjà dès la deuxième génération.

e. — *Culture sur un milieu nourricier solide.*

Des cultures convenables sur un milieu nourricier solide, ont fourni à Hansen des caractères plus distincts pour la détermination de plusieurs espèces de *Saccharomyces*. Il emploie pour cela du moût de bière avec addition d'environ 5 1/2 pour cent de gélatine dans de petits flacons bouchés avec des tampons de coton. Lorsque ces flacons sont infectés avec les six espèces connues (*Sacch. cerevisiæ I*, *Sacch. pastorianus I-III*, *Sacch. ellipsoideus I et II*) et placés à 25° C., il se produit dans l'espace de 11 à 14 jours, dans les végétations en voie de développement, de telles différences visibles à l'œil nu, qu'on parvient à distinguer quatre classes plus ou moins différentes l'une de l'autre. Le *Sacch. ellipsoideus I* fait exception ; sa surface de végétation se distingue par une structure particulière, en forme de réseau, de sorte que cette espèce peut être discernée des autres à l'œil nu. Si on emploie dans de semblables cultures de l'eau de levure avec de la gélatine en opérant à 15° C., on verra que le *Sacch. pastorianus II* forme, au bout de 16 jours, des végétations avec des bords assez unis, tandis que les bords du *Sacch. pastorianus III*, apparaîtront velus. Il résulte, dans ce cas, de l'examen microscopique, que les deux espèces peuvent aussi être distinguées morphologiquement. Mais ceci n'est pas du tout toujours le cas pour les cultures sur un milieu nourricier solide ; souvent même on trouve dans ces conditions, des différences moins grandes qu'avec des cultures dans des liquides nourriciers

Pour les espèces de *Mycoderma* et le *Sacch. membranæfaciens*, Hansen a trouvé, comme il est indiqué pages 235 et 207, des caractères très significatifs pour leur état

dans du moût gélatinisé où leurs colonies, à l'opposé de celles des *Saccharomyces*, s'étendent en forme de bouclier.

Il faut encore mentionner ici l'observation qu'il fit sur quelques espèces (par exemple *Sacch. Marxianus* et *Sacch. Ludwigii*) qui peuvent former sur un milieu solide un mycélium, à l'opposé d'autres qui n'en sont pas capables.

Pour quelques levures de culture M. P. Lindner trouva des différences notables dans leurs végétations sur gélatine.

L'extrême variabilité des caractères distinctifs qui se manifeste dans des cultures sur de la gélatine nutritive a aussi été démontrée, entre autres par M Will.

f. — *Action des Saccharomyces et des levures ressemblant aux Saccharomyces sur les sucres et autres constituants du liquide nourricier. Maladies de la bière.*

La première preuve convaincante de l'action très variée que peuvent exercer les différentes espèces de *Saccharomyces* dans le liquide nourricier, nous a été fournie par des essais faits sur *des cultures pures de levures, qui furent plus tard examinées dans la pratique*, et qui, après les découvertes de Hansen en 1883, furent préparées au laboratoire de Carlsberg et plus tard dans beaucoup d'autres laboratoires. Il existe des brasseries qui ont fait en grand, dans les mêmes conditions, des essais pratiques sur toute une série de races de levures, d'où il résulta que l'atténuation, le goût, l'arome, la clarification, la résistance contre les troubles occasionnés par les levures, etc., différaient absolument selon les races.

Les travaux de Hansen sur les *levures de maladie* (1883), qui ouvrirent des horizons nouveaux, ont encore une fois mis en lumière, à un tout autre point de vue, les différences essentielles qui existent entre les divers

Saccharomyces dans leur action sur le liquide nourricier. Car elles établissent parmi les levures dites sauvages, des groupes qui *provoquent des changements préjudiciables dans la bière*, et d'autres qui, au contraire, *ne causent aucune altération*. Parmi les premiers, il en existe de nouveaux *qui communiquent à la bière un goût amer et une odeur désagréable (Saccharomyces pastorianus I)*, ordinairement sans la troubler, tandis que d'autres ne manifestent entièrement leur action qu'à la fin de la fermentation secondaire *en troublant la bière* (*Sacch. pastorianus III* et *Sacch. ellipsoideus II*) qui, après le soutirage, laissent au bout d'un temps relativement court, un fort dépôt de levure. Ce n'est que lorsque ces espèces — *Sacch. pastorianus I*, *Sacch. pastorianus III et Sacch. ellipsoideus II* — sont introduites dans le moût *au début de la fermentation*, qu'elles peuvent produire la maladie. Une addition de levure de maladie à la bière dans les foudres ou à la bière soutirée, n'a aucune action sensible ; ce n'est que lorsque l'infection de la bière en bouteilles par le *Sacch. ellipsoideus II* est excessivement forte que son influence pourra se faire sentir. Le résultat principal est que le principe de cette contagion *se trouve dans le lerain*. Elle a présenté aux brasseries de très grandes difficultés et leur a fait subir de fortes pertes d'argent. Les observations de Hansen ont été en partie confirmées, en partie complétées par de nouveaux exemples dus à Messieurs Grönlund, Will, Lasché, Kokosinsky, Krieger, Windisch et Lindner.

Dans les brasseries à fermentation haute, les levures sauvages peuvent également susciter des troubles. C'est ainsi que, suivant de Bavay, le « *summercloud* » des brasseries australiennes (brasseries de fermentation haute), serait occasionné par un *Saccharomyces*. La bière est troublée par cet organisme et prend un goût acide et amer.

Dans la lie des foudres d'une brasserie, Lafar découvrit un *Mycoderma* produisant la formation d'acide acétique.

Tout récemment Pichi a aussi trouvé des levures de maladie dans le vin.

Les moisissures peuvent exercer des actions variées *sur les sucres* (pages 104, 116, 120) et les recherches très étendues de Hansen ont démontré que dans ce sens-là on pouvait aussi trouver pour divers *Saccharomyces* et autres champignons qui leur ressemblent, des *critériums caractéristiques*. Pour terminer, nous mentionnerons ici, à côté des *Saccharomyces* proprement dits, le *mycoderma cerevisiæ*, le *Sacch. apiculatus*, les formes de *Torula* et la *Monilia*.

Hansen a étudié l'action d'un grand nombre de *Saccharomyces sur les quatre sortes de sucres : Saccharose, maltose, lactose et dextrose.*

Ses six espèces connues de Saccharomyces (Sacch. cerevisiæ I, Sacch. pastorianus I, II et III, Sacch. ellipsoideus I et *II)* (page 187 et les suivantes) agissent de la manière suivante : elles secrètent toutes de l'invertine, transforment la saccharose en sucre interverti, lequel fermente ensuite ; elles font également fermenter la maltose et la dextrose, mais non pas la lactose. Toutes les levures de fermentation basse employées dans l'industrie, ont la même action sur ces quatre sortes de sucre.

Le *Sacch. Marxianus* (p. 204), le *Sacch. Ludwigii* (page 208) et le *Sacch. exiguus* (p. 205) ne font pas fermenter la maltose et la lactose ; ils interviertissent la saccharose et font fermenter des solutions nourricières de sucre interverti et de dextrose.

Le *Sacch. membranæfaciens* (p. 207) et le *Mycoderma cerevisiæ* (p. 235) ne possèdent pas de ferment intervertissant et ne font pas fermenter les sucres mentionnés [1].

(1) D'après les recherches de Laschè, il existe parmi les espèces de Mycoderma qui se trouvent dans la bière, plusieurs qui peuvent provoquer une fermentation alcoolique.

Le *Sacch. apiculatus* (p. 228) n'intervertit pas la saccharose; des quatre sucres il ne fait fermenter que les solutions de dextrose. Dans du moût de bière, il ne provoque par conséquent qu'une faible fermentation alcoolique.

Parmi les *formes de torula* (p. 221) examinées par Hansen, il en existe beaucoup qui ne peuvent pas secréter de l'invertine et faire fermenter la maltose, et ne produisent dans du moût de bière qu'environ 1 0/0 d'alcool en volume. D'autres espèces intervertissent la saccharose. Dans des solutions nourricières de dextrose, les différentes espèces suscitent des fermentations plus ou moins fortes.

La *Monilia candida* (p. 117) ne possède aucun ferment intervertissant, fait fermenter la saccharose (comme saccharose), la maltose et la dextrose. Dans du moût de bière, elle suscite une fermentation, mais à la température ordinaire de la chambre, elle n'arrive — en comparaison des *Saccharomyces* — que très lentement à des doses d'alcool plus élevées.

En résumant tous ces différents rapports entre les *Saccharomyces*, nous voyons qu'ils se divisent en deux grands groupes:

I. Ceux qui secrètent de l'invertine et provoquent une fermentation alcoolique. Ce groupe se divise encore en deux, à savoir:

(*a*) Ceux qui font fermenter vigoureusement non-seulement la saccharose et la dextrose, mais aussi la maltose (les six premières espèces de Hansen et les espèces de levures employées dans la brasserie).

(*b*) Ceux qui font fermenter la saccharose et la dextrose, mais non pas la maltose (*Sacch. Marxianus*, *Sacch. Ludwigii* et *Sacch. exiguus*).

II. Ceux qui ne secrètent pas d'invertine et ne provoquent pas de fermentation alcoolique (*Sacch. membranæfaciens*).

Les *levures sans formation d'endospores* (*non-Saccharomyces*) offrent, à l'égard du pouvoir intervertissant et de la fermentation, les combinaisons les plus diverses :

I. La plupart *ne font pas fermenter la maltose.* Un grand nombre d'entre eux provoquent dans des solutions de dextrose et de sucre interverti des fermentations plus ou moins vigoureuses. Quelques-uns (formes de Torula) intervertissent la saccharose; beaucoup ne possèdent pas de ferment intervertissant (*Mycoderma cerevisiæ, formes de Torula, Sacch. apiculatus*).

II. Une seule espèce (*Monilia candida*) fait fermenter la maltose ainsi que la saccharose (directement) et la dextrose, mais ne possède pas de ferment intervertissant.

Ceci nous apprend, comme Hansen le fait ressortir, que les *Saccharomyces* ne peuvent plus être caractérisés sans réserve comme ferments alcooliques.

En considérant le rôle des champignons sus-mentionnés dans l'industrie, nous reconnaissons immédiatement que ce n'est que parmi le genre *Saccharomyces* que l'on trouve des espèces qui font fermenter rapidement et fortement la maltose. Les brasseries et distilleries doivent donc chercher leur levure parmi les véritables *Saccharomyces*. Les *non-Saccharomyces*, dont le plus grand nombre ne fait pas fermenter la maltose, arriveront difficilement à jouer un rôle important dans ces industries. Ils pourront, par contre, être utilisés dans la préparation des vins de raisin et du cidre, attendu que plusieurs des espèces mentionnées peuvent exercer dans des solutions de dextrose et de sucre interverti une activité fermentative aussi énergique que celle des *Saccharomyces*.

Il ressort clairement de la classification précédente, qu'il faut toujours *faire choix de l'espèce convenable.*

Dans la *chimie analytique*, lorsqu'il s'agit d'analyser des solutions contenant plusieurs sortes de sucres dif-

férentes, ces rapports des différentes espèces de levures entre elles ont une importance particulière. Hansen émit principalement l'opinion que par cette voie on devait arriver à obtenir un dosage plus exact des différentes espèces de sucre contenues dans le moût. Dans ces derniers temps, plusieurs chimistes se sont occupés de cette question, sans cependant obtenir jusqu'à présent une solution satisfaisante.

La découverte de l'isomaltose par M. C. J. Lintner, ouvrit à l'étude de la composition du moût une nouvelle voie, et de plus ces recherches sont également appelées à jouer un rôle important pour l'intelligence exacte du procès de la fermentation.

Dans ces tout derniers temps, on a aussi commencé à faire de nombreuses recherches sur les levures dans le *lait*. M. Grotenfelt y découvrit un *Saccharomyces* (p. 210), MM. Duclaux, Adametz, Kayser et Beyerinck divers *non-Saccharomyces* (p. 226-227); tous ces organismes font fermenter la lactose. C'est en vain qu'on les a jusqu'à présent cherchés dans les brasseries.

Fermi trouva que certaines espèces de levures blanches et rouges peuvent exercer une action diastatique. Morris arriva à des résultats semblables par des expériences faites avec de la levure pressée.

Les actions variées des espèces de *Saccharomyces* sur le même liquide nourricier (moût de bière, moût de vin) et dans les mêmes conditions ont été étudiées par MM. Borgmann, Amthor et Marx.

Les fonctions chimiques des deux espèces de levure basse de Carlsberg n° 1 et n° 2 dans le moût de bière sont, suivant les recherches de M. Borgmann, très différentes. Avec ces deux espèces, après qu'elles eurent été employées pendant quelque temps dans la cave de fermentation, et pendant qu'elles étaient encore essentiellement pures, on mit en levain deux cuves en ar-

doise qui contenaient du moût du même brassin. Les fermentations s'effectuèrent dans des conditions permettant une comparaison sûre. Le séjour dans la cave de garde se fit comme d'habitude. Les différences dans le travail chimique ressortirent principalement des quantités d'acide libre (dans 100 centimètres cubes de n° 1 : 0,086 ; de n° 2 : 0,144, calculé comme acide lactique) et de la dose de glycérine trouvée dans la bière (n° 1 : 0,109, n° 2 : 0,137.

En se basant sur ces analyses, M. Borgmann fait la remarque que dans les deux bières, la proportion entre l'alcool et la glycérine est autre que dans les bières que l'on analyse d'ordinaire, attendu que les analyses antérieures donnèrent :

	Alcool	Glycérine
Maximum.....	100	5.497
Minimum	100	4.140

tandis que les bières de Carlsberg offrirent les proportions suivantes :

N° 1		N° 2	
Alcool	Glycérine	Alcool	Glycérine
100	2.63	100	3.24

On voit par là, comme M. Borgmann le fait d'ailleurs remarquer, que dans une fabrication irréprochable, on peut produire de bonnes bières, dont la proportion de l'alcool à la glycérine peut se trouver encore au-dessous du minimum admis autrefois.

Une série de *huit espèces différentes de Saccharomyces*, parmi lesquelles six espèces de levures de culture, toutes absolument pures, furent développées dans du moût par M. Amthor pour y être examinées au point de vue de leurs fonctions chimiques. Ses résultats ne font que confirmer de nouveau le principe de Hansen, qu'en pratique il faut toujours faire un choix. Les fermentations s'opérèrent dans des ballons Pasteur d'un litre, dans des conditions entièrement identiques, et en deux séries, dont

la première correspondait à la fermentation principale, la seconde en même temps à la fermentation secondaire. On détermina la quantité d'alcool, la quantité d'extrait, le poids spécifique, le degré de fermentation, la glycérine, l'azote, la substance réductive et le degré de coloration dans les moûts fermentés. Les tableaux qui furent dressés montrèrent, comme le fait remarquer l'auteur, des différences sensibles dans l'action chimique produite par les diverses espèces Ainsi la quantité d'alcool en volume contenue dans les moûts fermentés varia entre les limites 4,34 et 6,02 (3,55-5,94 après la fermentation principale), la quantité d'extrait se trouvait entre 8,27 et 11,23 (8,49 à 12,61 après la fermentation principale), le degré d'atténuation était entre 36,7 et 53,3 (28,8-52,1 après la fermentation principale ; la quantité de glycérine offrit des différences frappantes et balançait entre 0,08 et 0,15 ; les quantités d'azote, de substance réductive et en partie le degré de coloration montrèrent également une variabilité considérable.

Une série très importante des *Saccharomyces* que l'on rencontre dans le *moût de raisin* a été étudiée par M. Marx, non-seulement au point de vue botanique, mais encore par rapport à leur action chimique sur le liquide nourricier, après que ces espèces eurent été toutes cultivées à l'état de pureté absolue, d'après la méthode de Hansen. Le temps nécessaire à la sporulation était très différent, ainsi que le nombre de cellules qui formaient des spores et le nombre de spores contenues dans chaque cellule. En connexion avec cela, il est particulièrement intéressant d'apprendre que les espèces cultivées à l'état de pureté absolue accusaient des différences évidentes dans leur pouvoir fermentatif, dans leur faculté de produire des matières volatiles qui donnent au vin un bouquet spécial, et enfin dans la force de résistance contre plusieurs acides et contre des températures élevées. Comme les différences

de goût étaient fortement prononcées pour un nombre d'espèces, M. Marx appuie avec raison sur l'application pratique de pareilles recherches, attendu qu'en ajoutant à du moût de vin des levures possédant des propriétés connues, on rend ainsi possible la production d'un vin qui montrera des caractères distincts au point de vue du goût, etc.

Plus tard, M. Amthor a aussi examiné une série de cultures absolument pures d'espèces de *levures de vin* et a trouvé des différences typiques, tant sous le rapport de la sporulation que sous celui du temps employé pour la fermentation, et enfin, il trouva aussi des différences dans la composition chimique des vins. MM. Jacquemin, Rommier, Martinand et Rietsch en France, Müller-Thurgau en Suisse, Nathan et Wortmann en Allemagne Forti et Pichi en Italie, Mach et Portele en Autriche, obtinrent des résultats analogues, ces auteurs ayant en partie fait leurs essais comparés en grand et dans des conditions telles que les présente la pratique.

g. — *Des variations dans les différentes espèces de Saccharomyces.*

Les nombreuses recherches de Hansen ont démontré que les *Saccharomyces* se comportent de différentes manières, suivant les influences extérieures. Après les résultats indiqués dans les chapitres précédents, il est pleinement fondé d'établir une série, non-seulement des espèces de levures dites sauvages (espèces décrites antérieurement sous les noms collectifs de *Sacch. pastorianus*, *Sacch. ellipsoideus*, etc.), mais encore des espèces de levures hautes et basses nettement définies, qui sont utilisées en pratique. Il est d'une grande utilité pratique de savoir que dans des cultures, dans du moût de bière, entretenues pendant plusieurs années, les espèces ne montrè-

rent aucune ou seulement peu de variations. Mais, en obtenant ces résultats, Hansen trouva en même temps que par un traitement convenable, il est possible de produire dans plusieurs sens des variations ; les propriétés individuelles des cellules d'une culture absolument pure peuvent ici également se montrer. Quelques-unes des ces variations ne sont que passagères ; une culture appropriée les fait de nouveau disparaître, et l'espèce revient à son état primitif. D'autres sont plus énergiques ; la culture n'abandonne que par un traitement convenable ses qualités nouvellement acquises. Dans quelques cas de transformation, il n'a pas été possible, même par un traitement méthodique de plusieurs années, de ramener la culture à la forme primitive.

1. — Comme l'on sait, les données du temps nécessaire à *l'apparition des premiers rudiments des spores* dans les six espèces décrites plus haut, se basent sur la condition formelle, que la végétation doit avoir été préalablement cultivée *pendant 24 heures* dans du moût à environ 25° C. Déjà en même temps que Hansen indiqua, en 1883, les courbes de la température pour ses six espèces, il trouva que lorsque la végétation ne s'était développée à la température indiquée dans le moût qu'au bout de *deux* jours au lieu d'un jour, elle pousse ses spores plus lentement et moins abondamment qu'à l'ordinaire. Mais si après cela, on les traite dans le moût ainsi qu'il a été décrit, l'état normal apparaît de nouveau. Nous avons donc ici l'exemple d'une variation bien peu énergique.

2. — Dans une culture sur gélatine de la « *levure basse n° I de Carlsberg* », on trouve non-seulement des *cellules ovales*, mais on en trouve encore *d'autres qui sont allongées*, de sorte qu'on serait tenté de croire, suivant Reess, qu'on se trouve en présence de deux espèces. Si l'on introduit des colonies des deux espèces, chacune séparément, dans des ballons contenant du moût, on obtiendra encore ici

des végétations se composant en partie de cellules ovales, en partie de cellules de la forme « *pastorianus* ». Les expériences de Hansen démontrèrent que la végétation mentionnée en dernier lieu, continuée dans de nouveaux ballons, conserve pendant longtemps en partie des cellules allongées. Introduite dans l'appareil propagateur, la végétation montra encore un mélange de telles cellules, mais si l'on introduisait la levure qu'on en obtenait dans une cuve de fermentation ordinaire, elles disparaissaient. La variation est donc dans ce cas plus énergique; elle ne cesse que lorsque la levure a été propagée pendant une série de fermentations.

Un autre exemple dans ce même ordre d'idées est qu'un *Sacch. cerevisiæ* (levure basse) qui, après un développement long et pénible, avait été propagé dans du moût à 27° C. eut *des cellules d'aspect ordinaire*, tandis que cultivé à 7 1/2° C, il donna *des colonies enchevêtrées avec des ramifications ressemblant à un mycélium.* On a ici un exemple intéressant de l'influence qu'exerce la température sur la forme.

3. — Comme exemple bien plus accusé d'un changement dans la nature des cellules, on peut mentionner ses observations sur le *Sacch. Ludwigii*. Lorsque l'on soumet les individus isolés d'une culture absolument pure de nouveau à un élevage, chacun pris isolément à l'état de pureté, on peut obtenir des végétations montrant des *dispositions très différentes pour la formation des spores,* Par un choix méthodique des cellules individuelles, Hansen réussit à produire des végétations qui, dans les circonstances connues, ne développèrent pas du tout de spores. Contrairement à cela, il trouva en partant de la même végétation primitive que s'il choisissait une tache de levure provenant d'une cellule sporifère, et s'il continuait le développement de cette tache, il obtenait une végétation qui avait la faculté de reproduire immédiatement des

spores en abondance. Par un pareil choix méthodique, cette espèce fut divisée en trois formes végétatives dont l'une se distinguait par une sporulation vigoureuse, tandis que l'autre avait presque complètement perdu cette propriété, et que la troisième ne formait plus du tout de spores. Après de nombreuses cultures dans du moût, la troisième forme retrouva cependant sa sporulation, quoique lentement ; mais en la cultivant dans une solution de dextrose avec de l'eau de levure, cette propriété réapparaissait immédiatement.

Un autre exemple de transformation physiologique est le suivant. Les trois espèces du groupe *Saccharomyces pastorianus* décrites par lui forment, dans certains cas, un *dépôt pâteux* semblable à celui des autres *Saccharomyces*, dans d'autres cas au contraire, un *dépôt semblable à une membrane froncée*, ou un *dépôt caséeux* se composant de petits grumeaux (levure caséeuse de Pasteur), c'est-à-dire qu'elles forment des dépôts d'aspect très différent tout en étant cependant constitués par les mêmes espèces. Dans le dernier cas, le moût en fermentation prend aussi un aspect tout particulier parce que, contrairement à ce qui a lieu à l'ordinaire, la fermentation reste continuellement limpide. On peut donc parfaitement voir les flocons de levure s'élever du fond vers la surface et redescendre ensuite. Après de nouvelles fermentations ininterrompues dans du moût, on peut transformer ce dépôt particulier en un dépôt pâteux.

Nous trouvons une transformation physiologique analogue dans les *formations de voiles des Saccharomyces* (p. 160).

4. — Au commencement de l'année 1889, Hansen (1) publia une série d'expériences ayant pour but de découvrir les conditions de la variation, et d'obtenir par voie

(1) Centralblatt für Bakteriologie und Parasitenkunde. Vol. V. page 665, 1889.

expérimentale de nouvelles races et si possible de nouvelles espèces. Ces études se continuent dans son laboratoire. Ce qui va suivre se trouve soit dans la publication mentionnée, soit dans ses publications ultérieures.

Il trouva pour plusieurs espèces de *Saccharomyces* que lorsque leurs cellules étaient cultivées pendant assez longtemps dans du moût oxygéné, *dans le voisinage de leur température maxima*, elles étaient influencées à tel point, qu'elles *perdaient leur puissance de former des spores,* et cela était toujours le cas pour les nombreuses générations développées peu à peu dans de nouvelles cultures à la température optima. Cependant les cellules avaient un aspect vigoureux et on continua à les cultiver dans des conditions variées à plusieurs égards.

Hansen réussit aussi à produire de ces transformations par culture sur un milieu solide. Les variétés nouvellement formées, comme Hansen les nomme provisoirement, n'ont pas seulement perdu leur puissance de sporulation, mais en même temps leur puissance de former des voiles.

Ces recherches auront leur contre-coup dans l'industrie, quoique d'une autre manière que les travaux précédents de Hansen. Parmi les espèces qui, par le traitement mentionné plus haut, perdent leur puissance de sporulation, appartient aussi l'espèce de levure basse n° 2 de Carlsberg, bien connue dans le monde de la brasserie. De nombreux essais démontrèrent qu'à côté de la transformation mentionnée, il s'opérait encore des transformations à d'autres points de vue dans le plasma des cellules. La végétation nouvellement formée donne une plus faible atténuation, parce qu'elle atteint plus lentement que d'ordinaire les proportions supérieures d'alcool; bref, elle agit d'une autre manière qu'au-

paravant, après avoir été soumise au traitement indiqué.

On ne saurait rien objecter contre la supposition, qu'on se trouve peut-être ici en présence de la formation de nouvelles espèces. Nous savons que l'espèce n'est pas une chose invariable et fixe, comme on l'admettait généralement du temps de Linné, mais que les caractères des espèces ne sont constants que dans de certaines conditions. L'éclaircissement complet de ce problème ardu et important nécessitera des essais nombreux et variés, poursuivis pendant longtemps.

Pour empêcher tout malentendu, il n'est peut-être pas inutile de rappeler ici, que les transformations remarquables décrites plus haut n'ont été provoquées que par une action violente et assez longtemps prolongée sur les fonctions vitales de ces cellules, et que ces transformations ne se présentent pas tant que le développement a lieu d'une façon normale.

Nous avons dans les brasseries et distilleries un exemple de l'énergie avec laquelle la cellule des *Saccharomyces* conserve, dans des conditions normales, sa puissance de sporulation. Ici les espèces de levures de culture ont continué à vivre pendant des siècles, et elles ont développé d'innombrables générations dans des conditions qui n'ont pas permis l'entrée en jeu des fonctions mentionnées, et cependant elles ont toujours conservé opiniâtrément cette propriété.

B. — *Formation mucilagineuse des levures.*

Dans de certaines conditions qui ne sont encore qu'insuffisamment connues, les colonies produites par le bourgeonnement des cellules de levure peuvent se réunir en amas irréguliers, qui tombent plus vite au fond que les cellules de levure isolées (cassure et clarification

dans les brasseries). Ceci est assurément en relation avec une partie du développement de la cellule de levure, que Hansen découvrit en 1884. Il observa que les *Saccharomyces* aussi bien que d'autres champignons bourgeonnants peuvent sécréter un *réseau gélatineux*, qui en le préparant se présente sous forme de cordes ou de lames dans lesquelles sont logées les cellules (Fig. 33 *A*. *B*.). Si l'on porte par exemple un peu de levure de brasserie dans un bocal qu'on recouvre et qu'on laisse en repos de manière à ce qu'elle se dessèche lentement, une trace de cette levure diluée dans une goutte d'eau montrera distinctement ce réseau (Fig. 33 *A*). Cette formation apparaît également dans les cul-

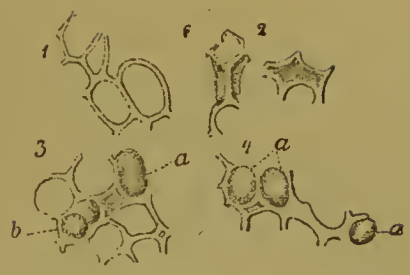

Fig. 33. — A.

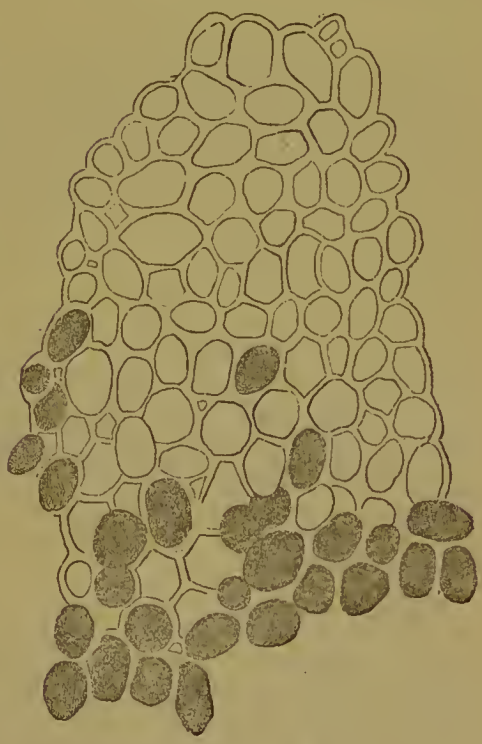

Fig. 33. — B.

Cellules de levure avec formation du réseau gélatineux d'après Hansen. **A** Le réseau a été obtenu par un desséchement partiel. **1** Partie formée par des cordes dont les cellules sont tombées; **2** et **3** montrent que le réseau peut en même temps affecter la forme de parois entières; une telle formation se trouve entre **a** et **b**; **a** est une cellule végétative, **b** une cellule avec deux spores; dans **4** on voit près de **a** trois cellules logées dans le réseau. **B** Formation de réseau et cellules de levure. Ces dernières ont été colorées avec du violet de méthyle. Le réseau est incolore. Quelques cellules se trouvent encore dans les mailles; la plupart sont déplacées.

tures sur des blocs de plâtre et sur de la gélatine. Après que Hansen nous y eut rendu attentif, nous avons nous même observé fréquemment cette remarquable formation dans des échantillons de levure, qui avaient été expédiés à notre laboratoire sous enveloppe dans du papier à filtrer [1]. Hansen l'observa également dans les formations de voiles de la plupart des espèces. Un simple examen microscopique du levain de brasserie ne décèle pas cette formation ; avec l'aide des colorations, elle apparaît cependant nettement (Fig. *B*). En lavant à plusieurs reprises la levure, on n'arrivait non plus à faire paraître le réseau par des colorations ; mais en éloignant l'eau et en laissant reposer les cellules pendant quelque temps, une préparation convenable put facilement faire réapparaître la masse mucilagineuse. En variant les conditions d'alimentation des cellules, le développement put être activé ou arrêté, et la composition chimique put être changée. Tout cela nous rappelle la formation des zooglées chez les bactéries.

Image microscopique d'une cellule de levure.

Comme introduction à la description systématique des différentes espèces de *Saccharomyces*, nous donnons ici une description générale de la cellule des *Saccharomyces*.

Vue au microscope, une cellule de levure, telle qu'elle se trouve le plus souvent dans un liquide en fermentation, apparaît comme un corps sphérique ou oval qui,

(1) Cette méthode, pour conserver longtemps un échantillon de levure, est très commode. On passe rapidement quelquefois par la flamme une petite feuille de papier à filtrer, sur laquelle on verse quelques gouttes de levure, puis on la plie et on la place ensuite entre plusieurs feuilles du même papier préparées de la même manière.

par le gonflement de sa paroi, produit un ou plusieurs bourgeons, qui peuvent tôt ou tard se séparer de la cellule-mère. Cette cellule est par conséquent entourée d'une membrane qui peut, dans les différentes phases du développement de la cellule, se développer quelque peu différemment, mais rarement d'une façon marquante. Le contenu de cette cellule se comporte par contre tout autrement. Pour se faire une idée nette de ce contenu, il faut observer la cellule dans sa période de croissance la plus énergique: le contenu consiste alors en un plasma hyalin et homogène. A mesure que l'activité végétative et fermentative augmente, plusieurs corpuscules de différente nature apparaissent dans ce plasma: des parties transparentes remplies de liquide (vacuoles) ou des grains plus ou moins grands, dont quelques-uns peuvent être considérés comme des globules de graisse, tandis que d'autres paraissent être plutôt de la nature du plasma. Ces corps (granules) ont été décrits en détail par M. Raum. Cette consistance granuleuse du plasma s'accentue avec le développement, et dans une période plus avancée de la fermentation, lorsque la cellule est arrivée presque à l'état de repos, le plasma peut se réduire en une fine couche tapissant les parois intérieures de la cellule. Le centre de cette dernière se remplit alors d'une grosse vacuole contenant de nombreux grains petits et grands, dont la plupart sont graisseux. Si l'on introduit de nouveau de semblables cellules dans un liquide fermentescible, elles montreront bientôt un aspect extrêmement caractéristique pendant la période qui précède les phénomènes de la fermentation, pouvant être distingués à l'œil nu. Les granulations disparaissent et de nombreux filaments plasmatiques font leur apparition dans le liquide transparent des cellules, où ils circonscrivent peu à peu des vacuoles arrondies; finalement, celles-ci disparaissent et

la cellule se trouve de nouveau remplie d'un plasma limpide et homogène.

Comme c'est le cas dans la plupart des cellules des plantes, on a aussi trouvé dans la cellule de levure un *noyau cellulaire* (Schmitz le découvrit le premier) que l'on peut rendre apparent en colorant avec de l'acide osmique ou de l'acide picrique et de l'hématoxyline. Suivant Hansen, ce noyau cellulaire est sphérique ou discoïde. Il trouva par exemple dans les vieilles formations de voiles des cellules de *Saccharomyces* qui, sans aucune préparation, montrèrent distinctement le noyau cellulaire.

M. Janssens constata la scission du noyau cellulaire aussi bien pendant le bourgeonnement que pendant la sporulation des *Saccharomyces*.

CLASSIFICATION SYSTÉMATIQUE DU GENRE SACCHAROMYCES.

CHAMPIGNONS BOURGEONNANTS, *dans la plupart des cas sans formation de mycélium, dont chaque espèce se présente avec des cellules de forme et de grandeur différentes. Un traitement déterminé fait apparaître des noyaux cellulaires qui, toutefois, peuvent aussi se présenter sans préparation préalable. Dans de certaines conditions, les cellules donnent naissance à des* SPORES ENDOGÈNES; *chez la plupart des espèces, les spores en germination croissent en formant des cellules bourgeonnantes; exceptionnellement elles forment d'abord un promycélium. Nombre des spores 1-10, le plus souvent 1-4. Les cellules sécrètent, dans des conditions favorables, un réseau gélatineux dans les mailles duquel elles se trouvent logées.*

La plupart des espèces provoquent une fermentation alcoolique.

Saccharomyces cerevisiæ I. — Hansen [1]
(Fig. 34-36).

Cette espèce et les cinq suivantes (*Sacch. pastorianus I*, *II* et *III* et *Sacch. ellipsoideus I* et *II*) produisent toutes de l'invertine ; elles transforment ainsi la saccharose en sucre interverti qu'elles font ensuite fermenter. Toutes font fermenter énergiquement la dextrose, ainsi que des solutions de maltose, surtout quand on y ajoute un peu de liquide nourricier, par exemple de l'eau de levure. Elles sont toutes de forts ferments alcooliques qui, cultivés dans du moût de bière, à la température de la chambre, produisent dans l'espace de quinze jours facilement de 4 à 6 0/0 d'alcool en volume. Dans la lactose, elles ne peuvent produire aucune fermentation.

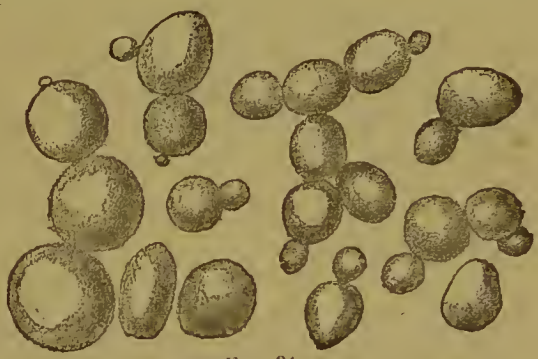

Fig. 34.

Saccharomyces cerevisiæ I. Hansen.

Formes cellulaires de la jeune levure déposée d'après Hansen.

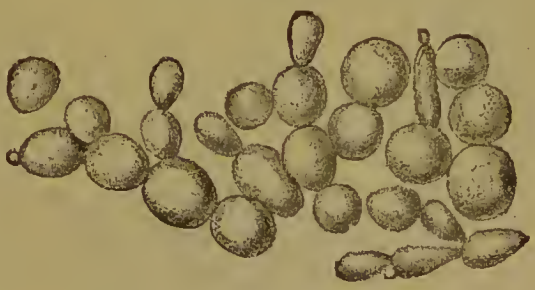

Fig. 35.

Saccharomyces cerevisiæ I. Hansen.

Formes de voiles à 15 — 6° C., d'après Hansen.

(1) Cette levure de fermentation haute ne doit pas être confondue avec la levure basse Carlsberg n° I de Hansen.

Fig. 36.

Saccharomyces cerevisiæ I. Hansen.
Formes cellulaires dans de vieilles cultures de voiles, d'après Hansen.

Le *Saccharomyces cerevisiæ 1* est une vieille *levure haute* anglaise, qui s'emploie dans les brasseries de Londres et d'Edimbourg.

La jeune végétation de levure de dépôt (Fig. 34) développée dans du moût de bière, consiste principalement en grandes cellules rondes ou ovales ; des cellules allongées proprement dites ne se présentent pas dans ces conditions.

Formation des ascospores (Fig. 26-28, 32,[1]) : ([1])

A	37 1/2 °C.	il ne se développe pas d'ascospores.	
» 36 — 37	»	les premiers rudiments des spores apparaissent au bout de	29 heures
» — 35	»	»	25 »
» — 33 1/2	»	»	23 »
» — 30	»	»	20 »
» — 25	»	»	23 »
» — 23	»	»	27 »
» — 17 1/2	»	»	50 »
» — 16 1/2	»	»	65 »
» 11 — 12	»	»	10 jours
» — 9	»	il ne se développe pas d'ascopores.	

Les spores ront très réfringentes. Leurs parois sont très distinctes. La grandeur des spores est de 2 1/2 à 6 μ.

Formation des voiles :

A	38° C.	aucune formation de voile.		
» 33 — 34	»	au bout de 9 — 18 jours	taches faiblement développées	
» 26 — 28	»	7 — 11 »	»	»
» 20 — 22	»	7 — 10 »	»	»
» 13 — 15	»	15 — 30 »	(fig. 35)	»
» 6 — 7	»	2 — 3 mois		
»	5	aucune formation de voile.		

(1) La préparation de la végétation d'une espèce de *Saccharomyces* pour de telles recherches se fait de la manière suivante : après avoir cultivé les cellules pendant quelque temps à la température de la chambre, dans du moût de bière ordinaire (d'environ 14° Balling), on introduit de jeunes et vigoureuses cellules de cette culture dans un nouveau moût de même composition, et on les laisse se développer pendant environ 24 heures à 25-27° C. Cette végétation se place alors sur des blocs de plâtre.

Aspect microscopique des cellules dans les voiles :

A 20-34° C. : Colonies fréquentes ; apparition de cellules allongées et d'aspect bizarre.

A *15-6°* C. (Fig. 35) : La majeure partie des cellules ont pris la forme de celles qui avaient servi à l'ensemencement ; des cellules isolées offrent des formes irrégulières.

Dans de vieilles cultures de voiles, toutes les formes cellulaires se présentent, jusqu'aux formes extrêmement allongées *ayant l'apparence d'un mycélium* (Fig. 36).

Saccharomyces Pastorianus I. Hansen.

(Fig. 37, 38).

Levure basse.

Formes de dépôt cultivées dans du moût : Les cellules allongées prédominent ; il se trouve aussi dans cette levure de grandes et de petites cellules rondes ou ovales (Fig. 37).

On le rencontre fréquemment dans l'air des locaux où a lieu la fermentation. Communique à la bière *un goût amer désagréable et une mauvaise odeur*, peut aussi amener un trouble de levure et entraver la clarification en cuve.

Formation des ascopores (Fig. 32,[2]) :

A	31 1/2°	C.	aucune formation d'ascospores.		
»	29 1/2 — 30 1/2	»	les premiers rudiments des spores apparaissent au bout de	30	heures
»	29	»	»	27	»
»	27 1/2	»	»	24	»
»	23 1/2	»	»	26	»
»	18	»	»	35	»
»	15	»	»	50	»
»	10	»	»	89	»
»	8 1/2	»	»	5	jours
»	7	»	»	7	»
»	3 — 4	»	»	14	»
»	1/2	»	aucune formation de spores.		

Fig. 37.

Saccharomyces Pastorianus I, Hansen.

Formes cellulaires de la jeune levure déposée, d'après Hansen.

Fig. 38

Saccharomyces Pastorianus I, Hansen. –

Végétations de voiles à 13-15° C., d'après les dessins de Holm dans le mémoire de Hansen.

Grandeur des spores 1 1/2-5 μ.

Formation des voiles :

A 34° C.	aucune formation de voile.		
» 26 — 28 »	au bout de 7 — 10 jours	taches faiblement développées	
» 20 — 22 »	8 — 15 »	»	»
» 13 — 15 »	15 — 30 »	(fig. 38)	»
» 6 — 7 »	1 — 2 mois		
» 3 — 5 »	5 — 6 »	comme la fig. 38, mais sans les grandes colonies	
» 2 — 3 »	aucune formation de voile.		

Aspect microscopique des cellules dans les voiles :

A 20-28° C. : A peu près les mêmes formes que dans la levure déposée.

A *13-15°* C. : Vigoureuses colonies ayant l'apparence d'un mycélium à cellules ordinairement très allongées ; des cellules en forme de boudin assez fréquentes (Fig. 38).

Dans de vieilles cultures de voiles, les cellules sont plus petites que dans le dépôt ; on trouve des cellules très bizarres, quelquefois presque filiformes.

Saccharomyces Pastorionus II, Hansen.

(Fig. 39. 40).

Produit une fermentation haute mais faible. Formes du dépôt développé dans du moût : principalement des cellules allongées, en forme de boudin. On trouve aussi de grandes et de petites cellules ovales ou rondes (Fig. 39).

Trouvé fréquemment dans les analyses d'air de la brasserie par Hansen ; semble appartenir aux espèces qui ne provoquent aucune maladie dans la bière.

Fig. 39.

Saccharomyces Pastorianus II, Hansen.

Formes cellulaires de la jeune levure déposée, d'après Hansen.

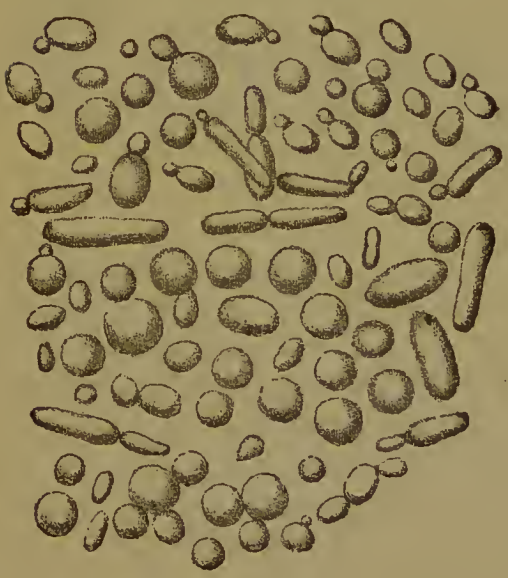

Fig. 40.

Saccharomyces Pastorianus II, Hansen.

Végétations de voiles à 15-3° C. d'après les dessins de Holm, dans le mémoire de Hansen.

Formation des ascospores (Fig. 32,[3]) :

A	29°C	aucun développement d'ascospores.	
» 27 — 28°	»	les premiers rudiments des spores apparaissent au bout de	34 heures
»	25 »	»	25 »
»	23 »	»	27 »
»	17 »	»	36 »
»	51 »	»	48 »
»	11 1/2	»	77 »
»	7 »	»	7 jours
» 3 —	4 »	»	17 »
»	1/2	aucun développement de spores.	

Grandeur des spores 2-5 μ.

Formation des voiles :

A	34° C.	aucune formation de voile.	
» 26 — 28	»	au bout de 7 — 10 jours taches faiblement développées.	
» 20 — 22	»	8 — 15	» »
» 13 — 15	»	10 — 25	»
» 6 — 7	»	1 — 2 mois (fig. 40).	»
» 3 — 5	»	5 — 6	»
» 2 — 3	»	aucune formation de voile.	

Aspect microscopique des cellules dans les voiles :

A 20-28° C. Presque les mêmes formes que dans le dépôt ; en outre des cellules bizarres, en forme de boudin.

A *15-3°* C. : Prédominance des cellules ovales et rondes.

Dans de vieilles cultures de voiles, les cellules sont plus petites que dans la lèvure déposée ; il s'y trouve des cellules très bizarres, quelquefois presque filiformes.

Dans de *l'eau de levure gélatinée*, des cultures en stries de cette espèce donnent, à 15° C., au bout de 16 jours, des végétations avec des *bords passablement unis*, ce qui la différencie aussi de l'autre espèce.

Saccharomyces Pastorianus III, Hansen.

(Fig. 41, 42).

Levure haute.

Formes du dépôt développé dans du moût : cellules en général allongées, en forme de boudin, accompagnées d'autres cellules grandes ou petites, ovales ou rondes (Fig. 41).

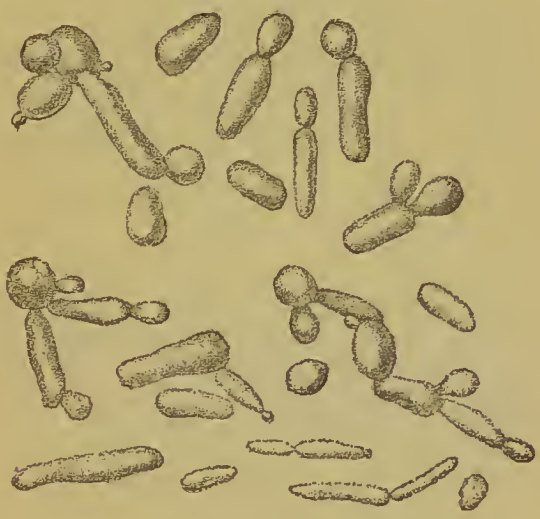

Fig. 41.

Saccharomyces Pastorianus III, Hansen.

Formes cellulaires de la jeune levure déposée, d'après Hansen.

A été extrait de bière de fermentation basse troublée par la levure et désigné par Hansen comme *formant une des espèces qui rendent la bière trouble.*

De nouvelles expériences de Hansen ont montré que cette levure de maladie possède une autre particularité : quand le moût en fermentation devient opalin, on peut, dans certains cas, par une addition de *Saccharomycès pastorianus III* déterminer une clarification.

Formation des ascospores (Fig. 32,[4]).

A	29° C.	aucun développement d'ascopores.	
» 27 — 28	»	les premiers rudiments des spores apparaissent au bout de	35 heures.
»	26 1/2	»	30 »
»	25 »	»	28 »
»	22 »	»	29 »
»	17 »	»	44 »
»	16 »	»	53 »
»	10 1/2	»	7 »
»	8 1/2	»	9 »
»	4	aucun développement de spores.	

Grandeur des spores 2-5 μ.

Formation des voiles :

A	34° C.	aucune formation de voile.	
» 26 — 28	»	au bout de 7 — 10 jours taches faiblement développées.	
» 20 — 22	»	9 — 12	» »
» 13 — 15	»	10 — 20	» »
» 6 — 7	»	1 — 2 mois	(fig. 42). »
» 3 — 5	»	5 — 6	» »
» 2 — 3	»	aucune formation de voile.	

Aspect microscopique des cellules dans les voiles :

A 20-28° C. : Presque les mêmes formes que dans le dépôt.

A *15-3°* C. : Colonies fortement développées de cellules allongées, en forme de boudin ou filiformes, dont l'aspect se rapproche beaucoup d'un mycélium (Fig. 42).

Dans de vieilles cultures de voiles, les cellules ont les mêmes formes qu'à 15-3° C, souvent même elles sont plus minces et plus effilées.

Dans de *l'eau de levure gélatinée*, des cultures en stries de cette espèce donnent à 15° C., au bout de 16 jours, des végétations aux *bords poilus* très accusés.

Fig. 42.

Saccharomyces Pastorianus III, Hansen.

Végétations de voiles à 15-3° C. d'après Hansen.

Saccharomyces ellipsoideus I, Hansen.

(Fig. 43, 44).

Levure basse.

Formes de la levure déposée développée dans du moût: cellules en général ovales ou rondes; les cellules allongées sont rares (Fig. 43).

Fig. 43.

Saccharomyces ellipsoideus I, Hansen.

Formes cellulaires de la jeune levure déposée, d'après Hansen.

Se trouve à la surface des *raisins mûrs.*

Formation des ascospores (Fig. 32,[5]).

A	32 1/2° C.	aucun développement d'ascospores.	
» 30 1/2 — 31 1/2	»	les premiers rudiments des spores apparaissent au bout de	36 heures.
»	29 1/2 »	»	23 »
»	25 »	»	21 »
»	18 »	»	33 »
»	15 »	»	45 »
»	10 1/2 »	»	4 1/2 jours.
»	7 1/2 »	»	11 »
»	4 »	aucun développement de spores.	

Grandeur des spores 2-4 μ.

Formation des voiles :

A	38° C.	aucune formation de voile.			
» 33 — 34	»	au bout de 8 — 12 jours	taches faiblement	développées.	
» 26 — 28	»	9 — 16		»	»
» 20 — 22	»	10 — 17		»	»
» 13 — 15	»	15 — 30	(Fig. 44)	»	»
» 6 — 7	»	2 — 3 mois		»	»
»	5	aucune formation de voile.			

Aspect microscopique des cellules dans les voiles :

A 20-34° C. et à 6-7° C., cellules plus petites, celles en forme de boudin y abondent plus que dans la levure du dépôt.

A *13-15°* C., colonies abondamment ramifiées et fortement développées de cellules en forme de boudin, courtes ou allongées, souvent avec des branches verticillées (Fig. 44).

Dans de *vieilles cultures de voiles*, on trouve les mêmes formes cellulaires qu'à 13-15° C.

Dans du *moût gélatiné* (moût de bière avec addition de 5 ½ % de gélatine), la culture en stries de cette espèce à 25° C. a, par opposition aux cinq autres espèces qui ont été décrites en détail, une *structure particulière en forme de réseau*, ce qui permet de la reconnaître à l'œil nu.

Saccharomyces ellipsoideus II, Hansen.

(Fig. 45, 46).

Provoque ordinairement une fermentation basse.

Formes du dépôt développées dans du moût : les cellules ovales et rondes prédominent ; les cellules allongées sont rares (Fig. 45).

A été trouvée dans des bières troublées par la levure. C'est une espèce *qui trouble la bière*, et qui, d'après les recherches de Hansen, est encore plus dangereuse que le *Sacch. pastorianus III*.

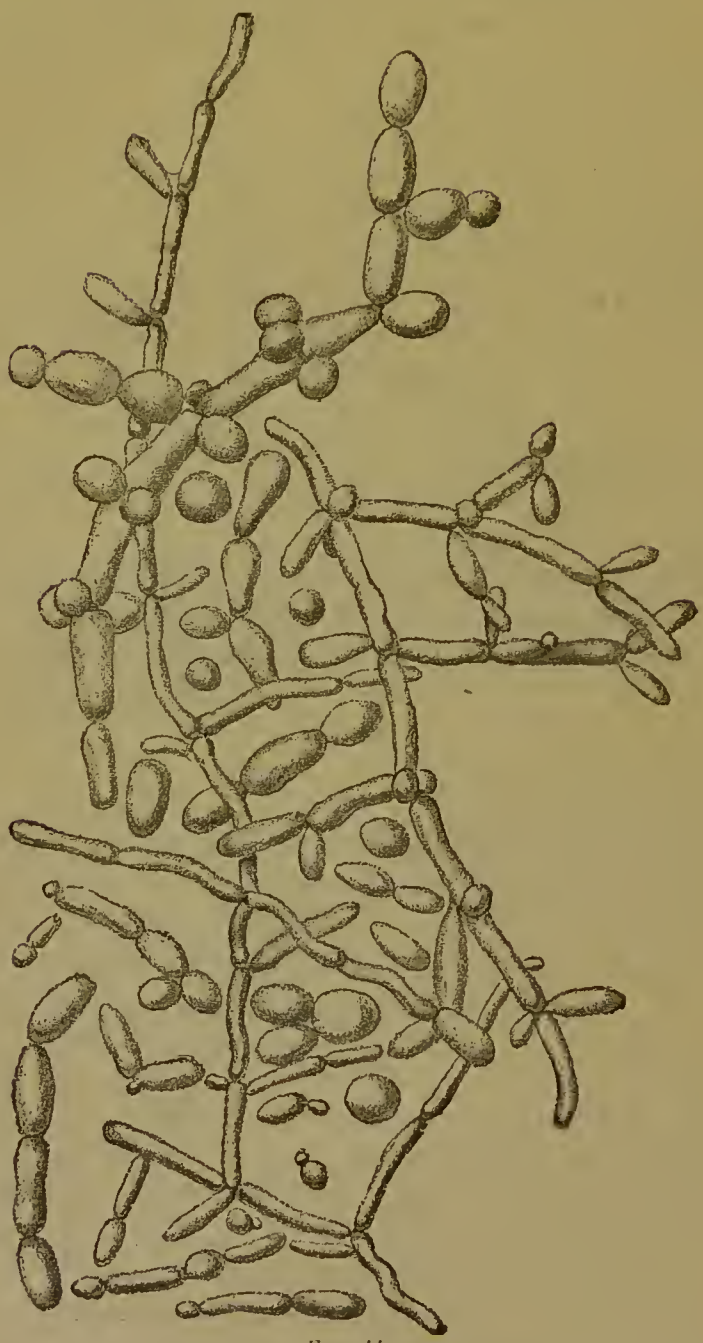

Fig. 44.

Saccharomyces ellipsoideus I, Hansen

Végétations de voiles à 13-15. C. d'après les dessins de Holm dans le mémoire de Hansen.

Formation des ascopores (Fig. 32,[6]) :

A	35°	C.	aucun développement d'ascospores.		
»	33 — 34	»	les premiers rudiments des spores apparaissent au bout de	31	heures.
»	33	»	»	27	»
»	31 1/2	»	»	23	»
»	29	»	»	22	»
»	25	»	»	21	»
»	18	»	»	42	»
»	11	»	»	5 1/2	jours.
»	8	»	»	9	»
»	4	»	aucun développement d'ascospores.		

Grandeur des spores 2-5 μ.

Fig. 45.

Fig. 46.

Saccharomyces ellipsoideus II, Hansen.

Formes cellulaires de la jeune levure déposée, d'après Hansen.

Végétation de voiles à 28-3° C., d'après Hansen.

Formation des voiles :

A	40°	C.	aucune formation de voile.		
»	36 — 38	»	au bout de 8 — 12 jours taches faiblement développées.		
»	33 — 34	»	3 — 4 »	(Fig. 46)	»
»	26 — 28	»	4 — 5 »		»
»	20 — 22	»	4 — 6 »		»
»	13 — 15	»	8 — 10 »		»
»	6 — 7	»	1 — 2 mois		»
»	3 — 5	»	5 — 6 »		»
»	2 — 3	»	aucune formation de voile.		

Aspect microscopique des cellules dans les voiles : à toutes les températures, les mêmes formes que dans la levure déposée, à 15° C. et aux températures inférieures les cellules sont seulement un peu plus allongées (Fig. 46).

Dans de *vieilles cultures de voiles* : colonies de cellules courtes et longues tubuliformes, des rameaux verticillés se présentent souvent. Il faut mentionner ici deux espèces ellipsoïdales, décrites par M. Will, qui se rapprochent de cette levure, et *qui donnent également lieu à des maladies de la bière. La première*, qui est une levure basse, donne dans du moût gélatiné des colonies offrant l'aspect, dans la période de jeunesse, — tant à la surface qu'à l'intérieur — d'un réseau à grandes mailles : plus tard le milieu devient plus compacte, tandis que les contours se frangent irrégulièrement. On voit cependant quelquefois, dans les mêmes conditions, des colonies compactes avec des bords réguliers. La température maxima de la sporulation est 39° C. ; à la température optima (34° C) les premiers rudiments des spores apparaissent déjà au bout de 11 heures. La limite inférieure de la température pour la sporulation se trouve de 4-5° C.. Dans du moût stérilisé les cellules végétatives succombent au bout d'une demi-heure en élevant la température jusqu'à 70° C. Pour la formation des voiles, les limites sont 41° et 4° C. C'est principalement dans de vieux voiles qu'apparaissent des colonies aux ramifications très nombreuses consistant en cellules très allongées. Cette espèce donne à la bière un *arrière-goût rèche et amer* ; elle occasionne en même temps un *trouble très prononcé*.

La *deuxième espèce* ellipsoïdale recueillie dans de la bière troublée par la levure, produit dans du moût gélatiné soit des colonies nettement dessinées, soit des colonies aux contours vagues. Les limites de la température pour la sporulation sont 32° et 0,5° C., l'optimum est à 24° C.

La limite vitale des cellules végétatives se trouve dans le moût à 70° C Dans de vieux voiles on rencontre des colonies bourgeonnantes très ramifiées. Sans compter le *trouble* que cette espèce occasionne dans la bière, elle lui donne encore un *goût doucereux*, *désagréablement aromatisé* et un *arrière-goût amer et astringent*. La levure déposée est toujours de couleur foncée.

Saccharomyces Ilicis Grönlund.

Celui-ci a été trouvé sur les fruits de l'*Ilex aquifolium* ; c'est une levure basse avec des cellules généralement sphériques. Les limites de la température de la sporulation sont 8° et 38° C. Les spores n'ont pas de vacuoles. Dans les voiles, on trouve des cellules faiblement allongées. Les cultures en stries sur de la gélatine ont l'aspect de farine, mais diffèrent essentiellement entre elles. La végétation de cette espèce donne au moût dans les ballons un goût amer et désagréable. Suivant Schjerning, cette espèce possède le ferment intervertissant et produit une fermentation alcoolique dans des solutions de saccharose, de dextrose et de maltose. Dans du moût de bière ordinaire, elle peut produire environ 2,8 0/0 d'alcool en volume.

Saccharomyces Aquifolii. Grönlund.

Ce *Saccharomyces* a été aussi trouvé sur les fruits de l'*Ilex aquifolium*. C'est une levure haute à grandes cellules rondes. Les limites de température pour la formation des spores se trouvent à 8° et à 31° C. ; les spores ont des vacuoles. Dans les voiles, on ne trouve que des cellules sphériques et ovoïdes. Les cultures en stries sur gélatine ont des aspects différents, quelques-unes sont brillantes, d'autres farineuses. Elle

donne au moût dans le ballon un goût d'une douceur désagréable avec un arrière-goût amer. Cette espèce intervertit la saccharose et provoque une fermentation alcoolique dans des solutions de saccharose, de dextrose et de maltose. Dans du moût de bière ordinaire, elle peut produire environ 3,7 0/0 d'alcool en volume.

Saccharomyces pyriformis. Marshall Ward.

Ce *Saccharomyces*, qui est le ferment de la bière de gingembre, a été décrit à la page 84.

Saccharomyces Marxianus. Hansen.

Cette espèce trouvée par M. Marx sur des raisins et décrite par Hansen, produit dans du moût de bière de petites cellules ovales et ovoïdes, qui ressemblent surtout à celles des *Saccharomyces exiguus* et *ellipsoideus*. Cependant il se forme rapidement des colonies de cellules allongées en forme de boudin, et lorsque la culture dans du moût reste suffisamment longtemps abandonnée à elle-même, il se forme de petits corpuscules ressemblant à des moisissures, qui flottent dans le liquide, ou qui se déposent au fond du récipient. Ces corpuscules sont composés de colonies ayant l'apparence d'un mycélium qui ressemble essentiellement à ceux des formations de voiles des six espèces décrites précédemment. Ici aussi, ces colonies sont formées de particules qui se détachent facilement à leurs points de jonction, où l'on voit des étranglements. Les ascospores sont réniformes, sphériques ou ovales. Après avoir cultivé cette espèce pendant 2 ou 3 mois dans du moût, dans des ballons à deux tubulures, on ne trouve que des traces de formations

de voiles, avec seulement peu de cellules allongées ou ovales.

Ce *Saccharomyces* appartient aux espèces qui, dans certaines conditions de culture, forment un mycélium sur un milieu nourricier solide.

Dans du moût de bière, ce champignon ne produit, même après un repos prolongé, que 1 à 1,3 0/0 d'alcool en volume. Il ne fait pas fermenter la maltose ; il intervertit des solutions de saccharose, et il produit des quantités assez fortes d'alcool dans des solutions nourricières de saccharose, et pareillement dans des solutions nutritives de dextrose.

Saccharomyces exiguus (Rees). Hansen.

Il développe dans du moût une végétation qui se rapproche le plus des formes cellulaires, auxquelles Reess a donné ce nom. Il est cependant impossible d'établir si cet auteur avait eu en vue précisément cette espèce, attendu que de pareilles petites formes cellulaires peuvent être produites par chacune des espèces de *Saccharomyces*, et que, dans de certaines conditions, elles se produisent même avec prédominance.

La formation de spores et de voiles est peu abondante ; par contre, cette espèce donne lieu à une formation de ceinture de levure bien marquée. Les cellules des voiles ressemblent à celles de la levure du dépôt, cependant les petites cellules et les courtes formes tubulées sont plus fréquentes.

Cette espèce a été trouvée par Hansen dans de la levure pressée. Vis-à-vis des sucres, elle se comporte à peu près comme l'espèce précédente, cependant elle manifeste une activité fermentative plus énergique dans des solutions de saccharose et de dextrose. Cultivée dans du moût de bière, elle ne produit, comme

l'espèce précédente, que de faibles quantités d'alcool. Elle ne provoque aucune fermentation dans des solutions de maltose. Elle intervertit la saccharose.

Des expériences de Hansen, faites dans la pratique, ont montré que cette espèce ne détermine pas de maladie dans la bière, lors même qu'elle serait ajoutée en très fortes proportions au commencement ou à la fin de la fermentation principale, ou à la fin de la conserve en cave. Ceci est d'un intérêt particulier, étant donné qu'antérieurement on avait beaucoup parlé du *Saccharomyces exiguus* comme levure de maladie.

Quelques autres espèces de *Saccharomyces* préalablement examinées par Hansen peuvent, comme les deux que nous venons de décrire, faire fermenter la saccharose et la dextrose, mais non pas la maltose et la lactose.

Au groupe de *Saccharomyces*, désigné sous le nom de *Saccharomyces exiguus*, il faut encore ajouter le *Saccharomyces Joergensenii*, qui a été décrit par M. Lasché. La végétation consiste en petites cellules rondes ou ovales. L'optimum pour la sporulation est 25° C.; les températures limites pour cette fonction sont 8° C. et 30° C. A des températures supérieures à 30° C., la végétation dépérit rapidement. Une vraie formation de voile n'a pas été observée : dans de vieilles cultures on n'observe qu'une formation très faible de ceinture de levure aux cellules rondes ou ovales. Sur de la gélatine, cette espèce développe des colonies ressemblant à celles de la levure basse de brasserie. Le moût gélatiné se liquéfie lentement par son action. La culture en stries est de couleur gris sale et a des bords lisses. Cette espèce ne fait pas fermenter la maltose mais bien la saccharose et la dextrose. Dans des mélanges avec des levures de culture dans du moût, son développement est par

conséquent entravé, et elle ne peut donc susciter aucune maladie dans la bière.

Saccharomyces membranæfaciens. Hansen.

Cette espèce singulière, qui occupe une place toute particulière parmi les *Saccharomyces*, forme très rapidement, cultivée dans du moût, sur toute la surface du liquide, un voile très fort, d'aspect grisâtre et plissé. Celui-ci est composé principalement de cellules ovales et allongées, riches en vacuoles et paraissant en général plus ou moins vides. Il reste de l'air en abondance entre les différentes colonies.

Les spores se développent d'une manière luxuriante, non-seulement dans les conditions de culture ordinaires, mais même dans les voiles. Elles affectent des formes très irrégulières et germent dans la chambre humide de Ranvier au bout de 10 à 19 heures, à la température ordinaire d'un appartement.

Sur du moût gélatiné, les cellules forment des taches d'un gris mat, tirant souvent, mais faiblement, sur le rouge. Ces taches sont arrondies et s'étendent en une surface plissée. Les taches renfermées dans la gélatine, au contraire, ont un aspect tout différent. La gélatine devient liquide par l'action de ce champignon, mais lentement il est vrai.

Cette espèce n'est pas capable de faire fermenter la saccharose et la dextrose, pas plus que la maltose ou la lactose, et elle n'intervertit pas la saccharose. Elle a été observée dans le mucilage sur les racines de l'orme ; elle montre une grande ressemblance avec les espèces *Mycoderma cerevisiæ* et *Mycoderma vini*, mais elle est un véritable *Saccharomyces*.

Kœhler la rencontra dans de l'eau de puits très sale.

Pichi fit la description de deux espèces de *Saccharomyces* qui ressemblent au *Saccharomyces membranæfaciens*.

Saccharomyces Hansenii. Zopf.

Celui-ci fut découvert par Zopf parmi les champignons qui se trouvent dans la farine des graines du cotonnier. Les spores sont sphériques, d'un très petit diamètre, et il ne s'en développe qu'une seule ou deux tout au plus dans la cellule-mère. Dans des liquides nourriciers sucrés et fermentescibles, il ne provoque pas de fermentation alcoolique, mais dans ce qui se dépose au fond des ballons on trouve des cristaux d'oxalate de chaux. Zopf trouva des formations de ce genre dans des solutions nutritives contenant de la galactose, de la glucose, du sucre de canne, du sucre de lait, de la maltose, de la dulcite, de la glycérine, et de la mannite.

Saccharomyces Ludwigii. Hansen.
(Fig. 29 et 30).

Cette espèce curieuse, qui a été découverte par M. Ludwig dans le mucilage du chêne vivant, est la seule parmi les *Saccharomyces* connus, dont l'identité puisse être établie par un simple examen microscopique. Donnons-en ici la description d'après les recherches de Hansen. Les dimensions des cellules varient beaucoup; on en trouve des elliptiques, quelques-unes en forme de flacon, d'autres allongées, tubuleuses, souvent d'autres encore affectant la forme d'un citron. Dans toutes les agglomérations de ces cellules, il peut se trouver des cloisons. Comme pour la plupart des *Saccharomyces*, les taches végétatives sont, dans le moût gélatiné, rondes, gris-clair ou jaune-pâle. Dans du moût, ce cham-

pignon ne produit, même après une fermentation de longue durée, que 1,2 0/0 d'alcool en volume ; concordant avec ceci, il faut remarquer que la maltose ne fermente pas par l'action de cette espèce. Dans des solutions de dextrose, il se produisit par contre jusqu'à 10 0/0 d'alcool en volume. Des solutions de saccharose sont interverties ; il ne provoque aucune fermentation dans des solutions de lactose et de dextrine, et aucune production de sucre dans de l'eau amidonnée. Des spores se forment facilement dans des solutions aqueuses de saccharose, sur du moût gélatiné, ainsi que dans de l'eau de levure et dans du moût, dans ce dernier cas, même lorsqu'il n'y a encore aucune formation de voile.

La sporulation (Fig. 29 et 30) est la plus active à 25° C. Ce qui constitue une particularité importante de cette espèce, *c'est que les spores, principalement lorsqu'elles sont jeunes et qu'elles ont germé, se fusionnent, et que les nouvelles formations ainsi produites continuent à pousser pour produire enfin un tube germinatif (promycélium)*, dont il se sépare peu à peu de nouvelles cellules de levure par des parois transversales nettement accusées. Les extrémités de ces cellules de levure poussent de nouveaux bourgeons, qui sont également délimités par des parois transversales.

Dans de vieilles cultures, il y a une grande prédisposition pour la *formation d'un mycélium*, mais on ne trouve que rarement et qu'exceptionnellement des groupes dont les membres soient fortement reliés entre eux et qui ne montrent que des étranglements peu accentués. Ces parties sont munies de parois transversales droites bien marquées. Chacune des cellules de ces colonies peut pousser des bourgeons et des spores. On trouve quelquefois des cellules bizarres et de très grandes cellules fortement ramifiées.

Ce qu'il y a de caractéristique pour cette espèce, c'est que les cellules périssent dans une solution aqueuse de saccharose déjà au bout de deux ans, tandis que la plupart des autres *Saccharomyces* étudiés jusqu'à maintenant peuvent vivre bien plus longtemps dans un pareil liquide.

Saccharomyces acidi lactici. Grotenfelt.

Grotenfelt décrivit sous ce nom un *Saccharomyces* qui, introduit dans du lait stérilisé, provoque une coagulation intense et en même temps une formation d'acide; sur la gélatine et sur l'agar, il forme des colonies blanches, d'un brillant de porcelaine; sur des tranches de pomme de terre il forme de larges taches humides, d'un gris clair, qui passent bientôt au brun. Dans les cultures par piqûre sur gélatine il s'y développe des gibbosités en forme de poire, partant des piqûres. Les cellules sont élipsoïdales; longueur 2,0-4,35 μ, épaisseur 1,50-2,90 μ.

En ensemençant une solution de lactose additionnée de carbonate de chaux, on put obtenir de l'alcool par la distillation. Introduit dans une solution neutre de lactose à 3 0/0, le *Saccharomyces acidi lactici* forma 0,108 0/0 d'alcool dans l'espace de huit jours.

Saccharomyces minor. Engel.

Les cellules végétatives sont absolument sphériques, elles ont jusqu'à 6 μ de diamètre, et sont réunies en chaînettes ou en petits flocons de 6 à 9 cellules. Les cellules sporifères ont de 7-8 μ et contiennent de 2-4 spores de 3 μ de diamètre.

D'après l'auteur mentionné, cet organisme est le ferment le plus actif dans la fermentation panaire (1).

(1) Des essais décisifs sur les *agents essentiellement actifs dans la panification* n'ont pas encore été faits jusqu'à présent. Pour le pain blanc on emploie ordinairement la « *levure pres-*

Saccharomyces anomalus. Hansen.

(Fig. 31 et 47)

Cette espèce très particulière a été trouvée par Hansen dans une levure de brasserie impure de Bavière. Dans le moût elle provoque une fermentation rapide et vigoureuse, et forme dès le début de la fermentation un voile gris mat.

Pendant sa fermentation, le liquide dégage une odeur de fruits éthérée.

Dans le moût, les cellules sont petites, ovales et sont

sée », dont la masse principale est composée de ferments alcooliques, et l'on admet généralement qu'ici la levure est le seul ferment actif. Pour la préparation du pain bis, et dans certaines contrées pour celle du pain blanc, on emploie le « *levain* », c'est-à-dire de la pâte aigrie, pétrie avec de la farine, du son et de l'eau, qui sert à provoquer la fermentation spontanée. Ce levain contient un grand nombre de bactéries, et des cellules ressemblant aux levures, parmi lesquelles se trouvent aussi des ferments alcooliques. Les opinions sont très divisées en ce qui concerne l'importance de ces différents organismes pour la fermentation du pain bis.

Suivant M. Chicandard (1883) et M. Marcano, c'est une bactérie qui serait le ferment actif. Boutroux ramena la fermentation tant à l'action des bactéries qu'à celles des champignons bourgeonnants. Il mit plus tard l'activité de la levure alcoolique en première ligne. M. Laurent indiqua le *bacillus panificans* comme étant le principal auteur de la panification. Les recherches de M. Dünnenberger eurent pour résultat, que les champignons bourgeonnants seuls devaient être considérés comme organismes essentiels dans la fermentation panaire ; la levée de la pâte est produite en première ligne par l'acide carbonique qui se dégage par la fermentation alcoolique, puis par l'expansion respectivement par la gazéification de l'air, de l'alcool, de l'eau et des acides sébaciques volatils produits par les bactéries. M. Peters trouva dans le levain quatre champignons bourgeonnants différents, dont le premier est à identifier avec le *Saccharomyces minor Engel.* Le deuxieme est à peu près de la même grandeur que le *Saccharomyces minor;* ses cellules

quelquefois allongées en forme de boudin; vues au microspique elles rappellent les espèces de Torulas. Quand le développement a duré un certain temps, il se présente, dans la levure déposée et dans le voile, beaucoup de cellules avec des spores.

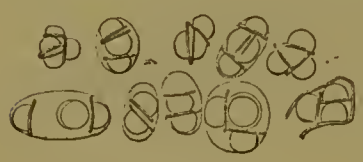

Fig. 47.

Spores du *Saccharomyces anomalus*, d'après Hansen. Quelques spores sont détachées, d'autres sont renfermées dans la cellule-mère. A droite, en bas, on voit la paroi déchirée d'une cellule-mère qui renferme encore trois spores.

Les spores poussent dans différents milieux nourriciers, tant liquides que solides, même dans des circonstances où les cellules-mères ont de la nourriture en abondance. Les cultures ordinaires sur blocs de plâtre à 25° C. donnent au bout de 40 heures un développement passablement avancé.

La *forme des spores* (Fig. 47) est très caractéristique; elles ressemblent à un hémis-

sont ovoïdes, et dans des liquides nutritifs elles se groupent en colonies assez grandes, continues, fortement ramifiées; il forme de nombreuses spores. Enfin on trouva encore une espèce de Mycoderma, et une autre que l'on ramène au *Saccharomyces cerevisiæ*. M. Peters décrit plusieurs espèces de bactéries du levain (voir pages 71, 75, 91). sans cependant faire mention d'aucune possédant toutes les qualités du *Bacillus panificans* de M. Laurent; on trouva au contraire plusieurs bactéries qui se partagent ces propriétés. Il est donc probable que M. Laurent avait opéré sur des cultures impures. Ces bactéries ne provoquaient ni fermentation alcoolique, ni développement de gaz considérable dans la farine stérilisée.

Les recherches que nous venons de mentionner constituent d'excellents travaux préparatoires pour des expériences décisives sur la cause et l'effet quand la pâte du pain lève.

Les maladies du pain bis — formation abondante de moisissures, pain devenant visqueux pour cause de surabondance des bactéries, — découvertes par MM. Uffelmann, Kretschmer et Niemitowiez, peuvent bien être mises sur le compte de l'impureté du levain, où les différents organismes se développent.

phère, avec un filet saillant partant de la base. Pendant la germination, elles gonflent et détachent des bourgeons (voir Fig. 31).

Après que Hansen eût attiré l'attention sur l'espèce remarquable de *Saccharomyces* sus-mentionnée, MM. Holm, Lindner et Will l'ont aussi examinée, peut-être aussi d'autres espèces qui s'en rapprochent, et qu'ils avaient également trouvées dans de la levure de brasserie impure. Les levures avec des spores en forme de chapeau ne paraissent donc pas être rares.

Comme cela a été dit précédemment, les spores de ce champignon ont de la ressemblance avec celles de l'*Endomyces decipiens*, et il existe peut-être un rapport plus intime entre ce *Saccharomyces* et ce champignon. On n'a cependant encore aucune preuve à l'appui.

Saccharomyces conglomeratus. Reess.

A été représenté ainsi par Reess : « Cellules bourgeonnantes rondes, de 5-6 μ de diamètre, réunies en grappes. La formation de ces grappes a lieu de la manière suivante : sur l'axe de deux vieilles cellules, avant que celles-ci ne poussent par bourgeonnement dans la direction de leur axe longitudinal toute une série de cellules, il se forme, la plupart du temps, simultanément, plusieurs bourgeons qui se ramifient. Les asques sont très fréquemment réunis deux à deux ou chacun avec une cellule végétative. Spores 2-4 qui, pendant la germination, donnent naissance à de nouvelles touffes. Sur des raisins en pourriture ou dans la levure de vin, au début de la fermentation. Action fermentative problématique. »

Dans les cultures de voiles des *Saccharomyces* de Hansen, il se présenta des colonies de cellules ayant l'aspect décrit plus haut, dans les vieux voiles des six

espèces étudiées en premier lieu par lui. Comme ce savant ne trouva jamais une espèce bien déterminée, pouvant être identifiée avec le *Saccharomyces conglomeratus* de Reess, il est porté à croire que les colonies des cellules dont il est question dans les différents *Saccharomyces*, sont identiques à cette espèce.

Les différentes races ou espèces de levure peuvent être divisées en deux groupes suivant l'aspect de la fermentation : en *levure basse* et en *levure haute*. Malgré de nombreuses affirmations, il a été impossible jusqu'à présent de convertir véritablement la levure basse en levure haute, et vice-versa. Suivant les observations de Hansen et Kühle, une levure de fermentation basse peut facilement produire des phénomènes passagers de fermentation haute ; mais ceux-ci disparaissent rapidement avec le développement progressif de la levure. Si donc on a soutenu autrefois que la levure basse, par exemple, pouvait être convertie en levure haute au moyen d'une culture conséquente à haute température, ces anciennes expériences ne peuvent être expliquées qu'en admettant que la levure basse était impure, et qu'elle contenait une certaine quantité de levure haute, qui, s'étant peu à peu développée à des températures élevées aux dépens de la levure basse, finit par constituer la masse principale de toute la levure.

Comme exemple de deux races différentes de levure basse, nous citerons les *levures basses* « n° 1 » (Fig. 48) et « n° 2 » (Fig. 49) de Carlsberg, qui sont employées dans la brasserie du *Vieux-Carlsberg*, près Copenhague, et dont nous allons donner une description un peu détaillée. Déjà le simple examen microscopique nous décèle des différences distinctes :

L'espèce n° 1 (Fig. 48) a des cellules plutôt allongées, parmi lesquelles on distingue des individus caractéristi-

ques plus petits, terminées en pointe. Lorsque la levure a été sortie de la cuve, lavée à l'eau et tenue peu de temps sous la glace, on remarque que le contenu de toutes les

Fig. 48.

Levure basse n° 1 de Carlsberg, d'après Hansen.

cellules devient très rapidement granuleux, et que, si on la conserve pendant plusieurs jours par le moyen indiqué, le nombre des cellules mortes augmente rapidement. Les cellules de l'espèce n° 2 (Fig. 49), prises de la cuve dans

Fig. 49.

Levure basse n° 2 de Carlsberg (quelques cellules contenant des spores), d'après Hansen.

des conditions normales, sont courtes et ovales, plusieurs presque sphériques ; ça et là apparaissent des cellules géantes (à gauche dans la figure). Dans la masse de levure, lavée à l'eau, les cellules conservent très longtemps leur contenu hyalin, faiblement granuleux, et la levure conservée de cette manière pendant assez longtemps ne montre que très peu de cellules mortes.

Cultivées dans de la gélatine, les deux espèces forment des colonies ayant l'aspect ordinaire de celles des *Saccharomyces*.

Dans les cultures sur blocs de plâtre, l'espèce n° 2 développe ses spores beaucoup plus rapidement et en plus grand nombre que l'espèce n° 1.

Dans la cuve, les phénomènes de la fermentation sont aussi très différents : le n° 2 donne une mousse très haute et compacte, et un couvercle épais ; le n° 1 forme une mousse basse, qui souvent ne recouvre pas entièrement la surface du liquide en fermentation, mais laisse des places nues. Le n° 2 produit asssez rapidement la clarification, tandis que cela n'a lieu que très lentement avec le n° 1. La levure n° 2 se dépose en couche consistante au fond de la cuve, tandis que la levure n° 1 déposée est ordinairement liquide. Dans la fermentation principale et dans la secondaire, le n° 2 donne une atténuation plus faible que le n° 1.

Les bières fabriquées dans la même brasserie avec l'une et l'autre de ces espèces de levure diffèrent beaucoup. Au point de vue du goût, la plupart des connaisseurs donnent la préférence au n° 2 ; ceci ne se discute pas ; en tous cas, le goût diffère de celui du produit du n° 1. Enfin les deux espèces sont très différentes sous le rapport de la résistance contre les troubles occasionnés par la levure. La bière fermentée par le n° 1 est sous ce rapport beaucoup plus résistante que celle qui provient du n° 2. Par conséquent le n° 1 convient spécialement à la fabrication des bières de garde et d'exportation, le n° 2 plutôt pour les bières en fûts et de consommation rapide. Ces caractères distinctifs de ces deux espèces sont restés invariables dans le courant des années. (Voir aussi les expériences de M. Borgmann, page 174).

La description que nous venons de donner des rapports microscopiques de ces deux types de levure basse, ne

peut, en aucune façon, être interprétée dans ce sens, que l'examen microscopique d'une espèce de levure inconnue peut nous faire reconnaître si celle-ci donnera en pratique une atténuation forte ou faible, une clarification lente ou rapide, etc. Les recherches de Hansen ont au contraire prouvé *qu'il est impossible d'établir par cette voie une règle générale*, attendu que des espèces provoquant une forte atténuation, pourront affecter le même aspect microscopique que d'autres espèces ne donnant lieu qu'à une faible atténuation. On n'aura un véritable point d'appui dans cet ordre de choses que lorsque nos connaissances sur la structure du plasma seront beaucoup plus avancées. Toutes les indications de ce genre sur les espèces de levure, parues jusqu'à présent dans la littérature, ne sont que des assertions propres à induire en erreur.

Un *groupement provisoire, fait au point de vue pratique*, des différentes espèces ou races de *levure de bière de fermentation basse et haute*, qui ont été cultivées à l'état pur, dans notre laboratoire, suivant la méthode de Hansen, est celui-ci:

A. — *Espèces de fermentation basse.*

1. Produisant une clarification très rapide et une atténuation faible dans la cuve; bière tenant bien la mousse. Pour une conservation de longue durée, celle-ci n'offre point de résistance contre le trouble par la levure. De telles levures ne conviennent guère que pour des bières en fûts (bières jeunes).

2. Produisant une clarification assez rapide et atténuant faiblement ; bière tenant bien la mousse; mousse frisée haute pendant la fermentation ; la levure forme un dépôt très consistant au fond de la cuve. La bière n'est pas particulièrement résistante contre le trouble par la

levure. Convient pour les bières en fûts et en partie pour les bières de garde.

3. Levures produisant une clarification lente et une forte atténuation ; la bière a un goût et un arôme fins. Le dépôt dans la cuve est passablement liquide. La bière est très réfractaire au trouble par la levure. Ces levures conviennent à la fabrication des bières de garde et surtout à celles d'exportation, qui ne sont pas pasteurisées ou traitées avec des antiseptiques.

B. — *Espèces de fermentation haute.*

1. Atténuant faiblement, clarifiant rapidement. La bière est douce au goût.

2. Atténuant fortement, clarifiant vite. Goût plus prononcé.

3. Atténuant fortement, clarifiant plus lentement ; *produisant une fermentation secondaire normale.* La bière est réfractaire au trouble par la levure.

Comme résultat très essentiel des expériences pratiques, il faut faire ressortir le fait, qui contribue à un haut degré à faire valoir la portée des caractères spécifiques des *Saccharomyces* soumis à la culture, savoir *que le groupement que nous venons d'établir est valable d'une manière générale, même dans les conditions pratiques les plus différentes, telles qu'elles peuvent se présenter dans des pays très éloignés l'un de l'autre.* Ainsi la race de Carlsberg n° 1 produit partout une bière très particulièrement résistante contre le trouble par la levure ; d'autres espèces, qui produisent une clarification plus rapide de la bière, ont aussi fait preuve de cette propriété partout dans des conditions de fabrication normales.

Encore un exemple de cette ténacité des propriétés spécifiques, dans des conditions extérieures très différentes, nous a été fourni par Irmisch dans une étude

comparée sur deux espèces de levures basses. Une de ces espèces atténuait faiblement et ne se multipliait que très peu dans le moût, l'autre produisait par contre une forte atténuation et avait une vigoureuse puissance de reproduction. La marche de la fermentation était toute différente d'une espèce à l'autre. Cette différence resta invariable même pour les degrés différents de concentration du moût primitif, pour des quantités variables de la levure d'ensemencement, pour des températures très différentes. Cette différence subsista aussi lorsqu'on fit emploi de cultures développées préalablement dans du moût diastasé, et encore en opérant dans des conditions d'aération très différentes sur du moût ordinaire ou sur un moût rendu très pauvre en maltose par un traitement spécial, ou bien enfin en présence des drèches pendant la fermentation et dans des solutions de sucre de canne. Même pour des fermentations qui avaient duré plus de six mois, l'examen du produit final démontra, que les différences typiques des deux espèces ne s'étaient pas effacées.

Outre la levure de bière haute, on emploie aussi des races particulières de fermentation haute, dans la *distillerie* et dans la *fabrication de la levure*. Pendant les dernières années, une série de levures de distillerie furent obtenues à l'état de pureté absolue dans le laboratoire de l'auteur. Elles offrirent tant dans les formes du dépôt que dans la formation des ascospores de grandes différences. Les espèces qui ont été introduites dans l'industrie ont aussi, sous ce rapport, fait preuve de propriétés différentes. Les mêmes observations ont été faites par MM. Delbrück, P. Lindner et Stenglein.

MM. Bèlohoubek, Schumacher et Wiesner ont effectué des analyses microscopiques et chimiques de levures de ce genre, et en particulier l'ouvrage de Bèlohoubek « Studien über Presshefe » (Prague, 1876) contient des descrip-

tions exactes de l'aspect microscopique de la levure pressée ordinaire dans les différentes phases de son développement, et des données sur le critérium microscopique de la qualité de la levure fabriquée, autant qu'il est possible d'en juger par le contenu des cellules. Les cellules de levure en décomposition modifient la couleur et la consistance du plasma. Celui-ci devient peu à peu plus foncé, fluide, les vacuoles grandissent, les limites nettement accusées entre les vacuoles et le plasma disparaissent peu à peu : ce dernier se retire de la paroi cellulaire et finit par se réunir pour former des masses irrégulières dans le liquide cellulaire; ce liquide cellulaire disparaît également, et enfin la paroi se dissout. En outre, il se présente dans la levure pressée, suivant les auteurs mentionnés, des cellules dans lesquelles apparaissent subitement un assez grand nombre de *petites* vacuoles ; ces « cellules anormalement vacuolisées » périssent rapidement.

AUTRES CHAMPIGNONS BOURGEONNANTS.

(Torula, Saccharomyces apiculatus, Mycoderma cerevisiæ et vini).

Comme appendice, nous donnons un aperçu de certains champignons ayant plus ou moins d'importance dans l'industrie de la fermentation, et qui ont ceci de commun avec les *Saccharomyces*, qu'ils se reproduisent par bourgeonnement ; ce n'est qu'exceptionnellement que nous rencontrons un mycélium parmi ces espèces. Ils se distinguent par contre des *Saccharomyces* en ce que la formation des spores endogènes, qui caractérisent ceux-là, fait ici tout à fait défaut.

A vrai dire, ces formes étudiées par Hansen, et qui forment un mycélium, devraient être classées parmi les moisissures. Cependant, comme la classe des moisissures

à laquelle elles appartiennent, n'a pas encore été systématisée, ces espèces trouveront leur place, pour des raisons pratiques, dans le présent chapitre.

Torula.

Les formes ressemblant à des levures, que Pasteur représente sous le nom de *Torula*, sont très répandues, et ne sont par conséquent pas rares à trouver dans des analyses physiologiques de la levure. Elles affectent tant la forme sphérique que la forme plus ou moins allongée, et se distinguent du genre *Saccharomyces*, comme Hansen l'a indiqué le premier, en ce qu'elles ne peuvent pas former de spores dans leur intérieur. Elles se multiplient dans la plupart des cas par bourgeonnement, dans un petit nombre de cas isolés en même temps par la formation d'un mycélium.

Hansen en a observé un grand nombre d'espèces différentes, et nous a donné une description exacte des suivantes.

La première apparaît dans le moût soit isolée, soit en colonies, se composant d'un petit nombre de cellules. Quelques-unes de ces dernières ont à leur centre une grande vacuole, parfois avec une granulation très réfringente. La grandeur des cellules est très variable (1 1/2-4 1/2 μ). Cette espèce ne sécrète pas d'invertine et produit dans le moût de bière une fermentation alcoolique à peine perceptible.

La *deuxième espèce* a dans les mêmes conditions des cellules plus grandes que la première (de 3 à 8 μ) ; elle ressemble à la précédente, seulement les cellules ont souvent, lorsqu'elles sont cultivées dans du moût, un contenu très granuleux.

La *troisième espèce* qui, vue au microscope, a le même aspect que la seconde, produit dans les mêmes conditions jusqu'à 7/8 pour cent d'alcool en volume ; elle forme une

mousse abondante et occasionne un fort dégagement d'acide carbonique ; elle ne peut cependant pas transformer la saccharose.

La *quatrième espèce* (2-6 μ) peut transformer la saccharose et produit dans du moût, avec formation abondante de mousse, un peu plus de 1 0/0 d'alcool en volume, mais elle ne fait pas fermenter la maltose.

La *cinquième espèce*, qui ressemble à la première (en ce qui concerne la forme et les dimensions des cellules), développe à la température ordinaire de la chambre, un voile homogène, gris mat, sur le moût et sur l'eau de levure, ainsi que sur de la bière de garde, et même sur des liquides contenant jusqu'à 10 pour cent d'alcool. Elle intervertit la saccharose et, dans de tels liquides, elle donne naissance à un faible voile. Par contre, elle ne provoque pas de fermentation alcoolique appréciable.

Une *sixième espèce* (Fig. 50), qui possède des cellules sphériques et ovales, produit dans du moût de bière une fermentation manifeste et jusqu'à 1,3 pour cent d'alcool en volume. Elle ne provoque aucune fermentation dans des solutions de maltose. Elle intervertit la saccharose et fournit 5,1 et 6,2 pour cent d'alcool en volume dans des solutions de ce sucre, de 10 et 15 pour cent dans de l'eau de levure, après 15 jours de culture à 25° C. ; cette dernière culture donna au bout de deux mois 7 0/0 d'alcool en volume. Des solutions de dextrose de la même concentration donnèrent dans des conditions analogues 6,6 et 8,5 pour cent d'alcool en volume.

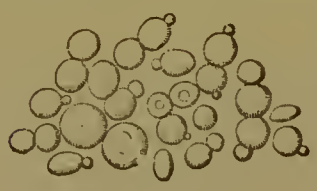

Fig. 50.

Torula, d'après Hansen.

Levure déposée après un jour de culture dans du moût à 25° C.

La *septième espèce* (Fig. 51 et 52) a été trouvée dans le sol au pied des ceps de vigne. Les cellules de la levure dépo-

sée sont le plus souvent ovales et en partie plus grandes que celles de l'espèce précédente. Les cellules des voiles ont quelquefois des formes très irrégulières. Cette *torula* ne donne dans le moût que 1 0/0 d'alcool en volume, ne

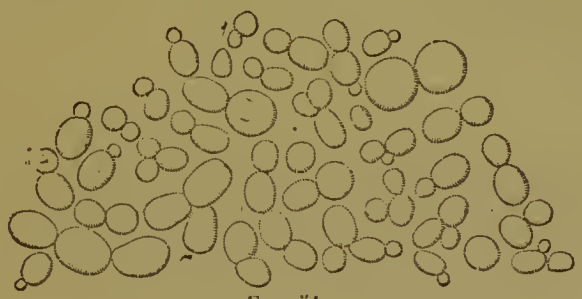

Fig. 51.

Torula, d'après Hansen.

Levure deposée après une culture d'un jour dans du moût à 25° C.

Fig. 52.

Torula, d'après Hansen (la même espèce que dans fig. 51).

Formation de voiles dans une culture de 10 mois dans du moût.

donne lieu à aucune fermentation dans de la maltose, pas plus que dans de la saccharose, qu'elle est incapable d'intervertir. Cultivée dans des solutions de dextrose dans de l'eau de levure à 10 et 15 0/0, elle produit au bout de 15

jours à 25° C, 4,6 et 4.5 0/0 d'alcool en volume. Au bout de 28 jours, les deux cultures contenaient 4.8 et 4.7 0/0 d'alcool en volume. Deux autres cultures donnèrent, après un long repos 4,8 et 5,3 0/0 d'alcool en volume. Hansen admet que cette espèce participe à la fermentation du vin, et qu'il est probable que des espèces telles que la sixième et la septième, qui produisent une fermentation énergique dans une solution de dextrose, jouent aussi un rôle dans la fermentation du vin et dans celle des cidres. Elles n'ont par contre probablement que peu d'importance pour les brasseries et distilleries, attendu qu'elles ne peuvent pas faire fermenter la maltose.

Une autre espèce de Torula (*Torula Novæ Carlsbergiæ*), qui se présente avec des cellules de formes très variées, a été décrite par M. Grönlund. Elle donne à du moût dans des ballons un goût désagréablement amer. D'après les recherches de Schjerning, cette espèce intervertit le sucre de canne et provoque une fermentation alcoolique dans des solutions de sucre de canne, de dextrose et de maltose. Dans du moût de brasserie ordinaire elle peut produire environ 4,7 0/0 d'alcool en volume.

Ces espèces de Torula, qui ne possèdent pas d'invertine, qui ne produisent qu'environ 1 0/0 d'alcool en volume dans des cultures dans du moût de bière, et qui ne peuvent par conséquent pas faire fermenter la maltose, sont très répandues dans la nature. Autant que les recherches permettent de juger, ces espèces provoquent une fermentation dans des solutions de dextrose.

Aux formes sus-mentionnées se rattachent le plus intimement les champignons bourgeonnants colorés en rouge (la levure rosée de la bactériologie médicale), qui sont généralement répandus dans la poussière de l'air. On en connaît plusieurs espèces, ainsi M. Kra-

mer trouva dans le cidre une levure Torula de fermentation haute, qui produit une matière colorante rouge, soluble dans l'eau. Elle fait fermenter la dextrose, et dans une solution à 10 0/0 elle produit 4,5 0/0 d'alcool en volume. Elle intervertit la saccharose et fait fermenter directement la maltose. Elle n'a aucune action sur la lactose.

Ces différentes espèces ne peuvent pas être distinguées rien qu'au microscope, pas même des cellules rondes des diverses espèces de *Saccharomyces*. Pasteur sépara les formes de Torula des autres levures, parce que les espèces dont il avait fait l'étude ne produisaient qu'une très faible fermentation alcoolique. Suivant les recherches indiquées plus haut, il existe cependant aussi parmi celles-ci des espèces ayant une activité fermentative prononcée.

Hansen admet avec quelque chance de probabilité qu'elles dérivent de champignons d'un ordre plus élevé, et il a en effet, dans ses essais de culture, observé la formation d'un mycélium dans quelques cas.

M. Duclaux a trouvé dans le lait un champignon qui produit dans une *solution de lactose une fermentation alcoolique*. Une transformation de la lactose en galactose ne fut pas observée. Ce champignon semble se rapprocher le plus du groupe des Torulas. Les cellules ont de 1,5 à 2,5 μ et sont presque sphériques. Suivant les essais de M. Duclaux, cette levure est plus aérobie que les levures alcooliques ordinaires. Malgré une forte aération du liquide, toute la lactose est absorbée pour la fermentation alcoolique. Dans une solution de lactose à 5 0/0, il se produisit au bout de 11 jours de fermentation à 25° C, 2,5 0/0 d'alcool. Dans un liquide neutre, la température de fermentation la plus favorable se trouve entre 25 et 32° C.; de 37 à 40° C, la fermentation cesse. De faibles quantités d'acides entravent l'activité fermentative de cette levure.

M. Adametz donne également la description d'un champignon bourgeonnant qui fait fermenter la *lactose*. Comme dans les cultures faites d'après la méthode de Hansen, ce champignon ne développe pas de spores endogènes, nous le rangeons également dans le groupe des *non-Saccharomyces*. Les cellules qui ont à peu près les mêmes dimensions que celles du *Saccharomyces cerevisiæ* sont rondes ou ellipsoïdales. Sur de la gélatine peptonisée, les colonies sont rondes, aux limites faiblement sinueuses, et de couleur brun foncé. La culture par piqûre dans du moût gélatiné fait voir à la surface une petite élévation plate et mate, ainsi qu'une végétation très forte dans le canal d'inoculation, duquel partent de nombreux rayons qui vont se perdre dans la gélatine. Dans du lait stérilisé, le champignon présente à 50° C., déjà dans l'espace de 24 heures, les phénomènes de la fermentation, à 38° C. au bout de 48 heures, à 25° C. au bout d'environ 4 jours. Dans cette fermentation, il n'y a que la lactose qui se décompose.

Ces deux dernières espèces furent étudiées d'une manière plus approfondie par M. Kayser, ainsi qu'une *nouvelle espèce*, qui fait aussi fermenter la lactose et qui appartient également aux *non-Saccharomyces*. Toutes les trois forment sur la gélatine des colonies plus étendues que celles des levures de vin et de bière ; au centre de la colonie se trouve une partie plus épaisse, le bord de la colonie est en forme de mycélium. Quand l'air a suffisamment accès, elles produisent dans le lait et dans des liquides neutres, de 25 à 30° C., une fermentation appréciable. Pendant la fermentation alcoolique, le lait ne devient pas visqueux et ne se coagule pas. Les trois espèces font fermenter la lactose, la galactose, la saccharose, la glucose, le sucre interverti et enfin la maltose, mais cette dernière avec beaucoup de peine. La fermentation de la lactose par ces espèces

produit des liquides aussi riches en alcool que les bières les plus fortes. M. Kayser fait remarquer qu'il sera peut-être possible d'utiliser cette observation en pratique, car on peut, par l'intermédiaire de ces espèces de champignons, transformer en un liquide spiritueux les grandes masses de petit-lait, qui proviennent de la fabrication du fromage.

Deux espèces de levure faisant également fermenter la lactose, et qui sont aussi à considérer provisoirement comme des *non-Saccharomyces*, ont été décrites par M. Beyerinck. Ce sont le « *Saccharomyces Képhir* », trouvé dans les grains de képhir, qui se compose de cellules allongées, de formes différentes, développant sur de la gélatine nutritive des colonies quelque peu sinueuses, et le « *Saccharomyces tyrocola* », dont les cellules sont petites, arrondies, et qui donne sur de la gelatine des colonies d'un blanc de neige. M. Beyerinck a trouvé que ces deux espèces sécrètent un ferment intervertissant particulier (*la lactase*), qui transforme non-seulement le sucre de canne, mais encore la lactose, par contre, ce ferment n'intervertit pas la maltose. On peut préparer la lactase en ajoutant à une solution de lactose, à 5 0/0 des sels nutritifs et de l'asparagine, puis en la faisant fermenter au moyen de la levure de képhir, et en précipitant avec de l'alcool le ferment dans le liquide fermenté filtré. M. Schuurmans-Stekhoven trouva cependant que le ferment de la levure de képhir de M. Beyerinck n'intervertit pas la lactose.

M. Bourquelot a déjà démontré depuis quelque temps que l'*Aspergillus niger* possède un ferment chimiquement soluble ayant de la ressemblance avec l'invertine de la levure de bière, dont il se distingue par le pouvoir qu'il a de transformer la maltose en glucose. Il fait remarquer que nous nous trouvons peut-être ici en présence d'un mélange de deux ferments,

de même qu'on considère aujourd'hui la diastase comme un mélange de plusieurs ferments. Une telle question se posera chaque fois que l'on sera en présence d'un ferment chimiquement soluble, jouissant de plusieurs sortes d'activité.

Saccharomyces apiculatus. Reess.

(Fig. 53).

Comme on l'a déjà fait remarquer, le nom de ce champignon n'est pas correct d'après la manière actuelle d'envisager ces questions, car on ne peut ranger parmi les *Saccharomyces* que les levures qui développent des spores endogènes. Or, le champignon qui nous occupe n'est pas de ce nombre. Conformément à Hansen, nous voulons conserver provisoirement l'ancien nom générique, jusqu'à ce que l'on ait une classification plus exacte du système.

On sait que ce champignon donna lieu à une des études biologiques les plus belles et les plus complètes de Hansen, qui arriva, par des recherches poursuivies pendant plusieurs années, à établir ses habitats dans la nature, ainsi que ses migrations régulières pendant les différentes saisons de l'année. La raison qui avait fait choisir cette espèce comme objet de recherches exactes est que, contrairement aux autres espèces qui affectent des formes excessivement variées et indéterminées, ce qui rend l'étude de leur apparition en divers lieux très sujette à caution, ce champignon-ci peut toujours être reconnu avec certitude à sa forme, attendu que dans les cultures, il se présente toujours avec des cellules en forme de citron. C'est là la forme typique de l'espèce.

On trouve ce champignon en quantité abondante dans la levure de vin, surtout dans les premières phases de la fermentation, ainsi que dans les bières belges à fermentation spontanée ; dans la nature on

Fig. 53

Saccharomyces apiculatus, d'après Hansen.

Cellules bourgeonnantes. **a-a''** une cellule qui, à son extrémité inférieure, pousse un bourgeon dans l'espace de 3 1/4 d'heures ; **b-b''** une série de développement analogue, où le bourgeon se développe à l'extrémité supérieure de la cellule-mère, tandis que déjà précédemment un bourgeon s'était séparé de l'extrémité opposée ; **c** représente une série de cellules, **c'** la même 3/4 d'heures plus tard ; le bourgeon inférieur avait atteint, comme les cellules superposées, la forme typique de l'espèce, mais dans la figure elle est vue par l'extrémité, de sorte que l'axe longitudinal est perpendiculaire au papier. **d-d''** développement en 1 1/4 d'heure ; **e-e'''** en 2 1/4 d'heures ; **f-f''''** en 3 heures. On voit dans **e-f** que les cellules ovales forment d'abord un bourgeon et ne prennent que plus tard la forme typique d'un citron. **g-m** cellules anormales et séries de développement.

le trouve en abondance sur des fruits mûrs, doux et juteux.

On peut suivre son développement en portant une parcelle d'une pareille végétation dans une goutte de liquide nourricier sous le microscope. Comme Hansen l'a indiqué le premier, ce développement est très bizarre (*c*, *f*, Fig. 53). On voit que les bourgeons provenant des cellules typiques en forme de citron peuvent également affecter la forme d'un citron (*a*, *b*, *c*, *e*, *f*), ou devenir ovales (*a-c*); on remarque aussi que les cellules ovales sont obligées de former un ou plusieurs bourgeons avant de pouvoir prendre la forme d'un citron (*e-f*), et enfin que la forme de citron qu'une cellule a acquise par bourgeonnement (*k*, *k'*, *k''*), peut de nouveau disparaître pendant le prochain bourgeonnement (*k'''*). Dans d'autres circonstances, les cellules peuvent prendre des formes entièrement différentes : la forme allongée, celle d'une demi-lune, l'aspect de bactéries, etc. (*g-m*). Existe-t-il une règle dans cette confusion apparente des formes ? Dans ce qui précède, on a vu que le champignon pouvait détacher deux espèces de bourgeons, et que les bourgeons ovales sont obligés de détacher un ou plusieurs nouveaux bourgeons avant de prendre la forme typique. La question est alors celle-ci : dans quelles conditions les deux espèces de bourgeons se développent-elles ? Des essais de culture ont établi que les bourgeons en forme de citron se développent principalement dans les premières phases de la culture, et que plus tard ils font de nouveau place à ceux aux formes ovales.

Nous allons donner une description plus détaillée de ce champignon au point de vue physiologique et biologique.

Le *Saccharomyces apiculatus* est une forme de fermentation basse pouvant produire de l'alcool dans le moût de bière ; la fermentation est cependant faible

dans ce liquide, attendu qu'il ne s'y produit que 1 0/0 d'alcool en volume, tandis que dans les mêmes conditions, le *Saccharomyces cerevisiæ* (levure basse) en fournit jusqu'à 6 0/0 en volume. Ceci provient *de ce que le champignon n'est pas capable de faire fermenter la maltose*. Hansen découvrit de plus la propriété du *Saccharomyces apiculatus*, *de ne pas sécréter d'invertine*. Dans des solutions à 15 et à 10 0/0 de dextrose dans de l'eau de levure, il engendre par contre une fermentation énergique, et dans le cours d'une expérience il produisit jusqu'à 3 0/0 d'alcool en volume. Au bout de trois mois, la réaction sur le sucre se faisait encore avec succès, tandis que la quantité d'alcool n'avait pas augmenté dans les six dernières semaines. Le champignon était donc incapable d'achever la fermentation. Dans une autre expérience de Hansen, il se produisit jusqu'à 4,3 0/0 d'alcool en volume.

Des expériences dans lesquelles ce champignon fut cultivé dans du moût de bière après avoir été mélangé avec le *Saccharomyces cerevisiæ*, démontrèrent que tout en étant à titre de plus faible, refoulé par ce dernier, il n'en entravait pas moins sensiblement le développement de la levure de culture.

Dans des ballons avec du moût identique, exposés à la même température et contenant chacun une seule des deux espèces, le *Saccharomyces apiculatus* se sera, au bout du même temps, multiplié plus fortement que le *Saccharomyces cerevisiæ*.

En tant que ce champignon, à l'époque critique de l'année, apparaît en assez grande quantité dans le moût, il peut subsister à côté du *Saccharomyces cerevisiæ* pendant un temps assez long et en entraver quelque peu le développement ; mais lorsque la bière est amenée dans la cave de garde, le champignon reste inactif dans le liquide alcoolique, et souvent il y périt.

Les parties les plus intéressantes de la vie de ce champignon sont les *conditions*, également mises en lumière par Hansen, *dans lesquelles il vit à l'état de liberté dans la nature*. Des recherches microscopiques et des essais de culture démontrèrent que, dans le courant de l'été, *le champignon se trouve en abondance sur les fruits doux et juteux* (cerises, groseilles, fraises, raisins, prunes, etc.) *lorsque ceux-ci sont arrivés à l'état de maturité*. Par contre, on ne l'a trouvé que rarement et exceptionnellement sur les mêmes fruits, lorsqu'ils étaient encore verts. Comme on le trouve sur les fruits mûrs indiqués à l'état de bourgeonnement énergique, et qu'on ne le rencontre jamais ou qu'exceptionnellement sur d'autres fruits, sur des feuilles, sur des branches, etc., il est donc prouvé que c'est sur des fruits mûrs de ce genre que se trouve son véritable foyer de developpement. Ceci ressort aussi du fait que toujours, et sans exception, on l'a trouvé dans la terre immédiatement sous les cerisiers, les pruniers, la vigne et les autres plantes portant les fruits sur lesquels il avait son siège, et que ce n'est que très rarement qu'on l'a vu dans les nombreux échantillons de terre recueillis dans divers autres endroits. Les fruits qui tombent des arbres et la pluie amènent le champignon à la surface de la terre d'où il pénètre à son intérieur, et la question qui se pose désormais est de savoir s'il peut aussi hiverner dans ce nouveau milieu. La réponse a été obtenue par deux voies différentes, soit en portant, pendant l'hiver et au printemps, de nombreux échantillons de terre pris dans ces endroits, dans des ballons contenant du moût — où ils provoquèrent presque toujours une végétation abondante du champignon qui nous occupe — soit en introduisant avec toutes sortes de précautions, une culture du *Saccharomyces apiculatus* dans la terre, et en l'abandonnant à elle-même pendant l'hiver. Au printemps et au commencement de l'été, on examinait

cette terre, et les essais de culture démontrèrent, que dans toutes les épreuves, le champignon avait survécu. Il a été prouvé ainsi que le champignon *peut* hiverner dans la terre, et comme il a été montré précédemment, qu'en réalité il ne peut se trouver uniquement que dans la terre des endroits indiqués. Dans des expériences ultérieures de Hansen, on avait introduit de fortes végétations de ce champignon dans des bougies Chamberland bien closes, à fleur de terre. Au bout de trois ans, on porta le contenu de ces bougies dans du moût stérilisé, et il s'y développa une végétation abondante de ce champignon. L'évolution peut donc durer plus d'une année.

Enfin, il restait encore à prouver que la terre est son *véritable* habitat d'hiver ; c'est ce que fit Hansen en analysant, de janvier à juin, la poussière recueillie dans les endroits les plus divers, beaucoup de fruits desséchés tombés à terre, et enfin divers excréments. Les 71 analyses ainsi obtenues donnèrent un résultat négatif, et par là la preuve était fournie que : *le véritable habitat d'hiver du champignon est la terre au pied des plantes mentionnées.* Il conserve son aspect ordinaire durant les longs mois d'hiver, et il est de nouveau ramené dans l'air en été par les forces réunies des insectes et du vent, qui le colportent de fruit en fruit.

Il est évident qu'à l'époque à laquelle ce champignon se trouve en quantité abondante sur les fruits mûrs susmentionnés, il peut également être déposé par l'air en d'autres endroits, par exemple sur des fruits verts. Déjà, dans son premier mémoire, Hansen avait indiqué que *la rareté de la présence de ce champignon sur des fruits verts était due à ce que sur ceux-ci il périssait rapidement, soit à cause du manque de nourriture, soit à cause du desséchement de ses cellules.* Plus tard, il a prouvé par des expériences, l'exactitude de cette supposition. Il répartit dans de l'eau des cellules jeunes et vieilles et les porta

en couches minces, soit sur des porte-objets, soit sur du coton étiré en houppes fines, après quoi il les laissa sécher à l'abri des rayons du soleil. En moins de 24 heures, toutes les cellules étaient mortes. Il est évident que les cellules qui se trouvent isolées sur des fruits encore verts, se trouvent dans des conditions encore plus défavorables que dans l'expérience. Si, par contre, on enveloppe les cellules dans des couches plus épaisses de ouate ou de papier à filtrer, elles restent en vie beaucoup plus longtemps, comme dans la terre, par exemple, plus de huit mois dans du papier à filtrer.

Il n'existe pas encore d'études approfondies sur l'évolution d'autres ferments alcooliques. *On trouve d'une manière très générale des Saccharomyces sur les fruits qui fournissent un jus doux.* Hansen poursuivit pendant plusieurs années des études analogues à celles que nous venons de décrire, exécutées sur des *Saccharomyces* que l'on rencontre fréquemment dans les jardins fruitiers, tels que le *Saccharomyces pastorianus I*, le *Saccharomyces ellipsoideus I*, puis sur la levure basse de Carlsberg n° 1, et sur quelques levures hautes. Il trouva toujours que, *semée dans la terre au mois de septembre, elles étaient encore vivantes au bout d'un an.* Quelques espèces avaient formé des spores à la surface de la terre. Il est probable que des expériences futures démontreront, aussi pour les véritables *Saccharomyces*, que les fruits constituent leur foyer de développement pendant l'été, et que la terre est leur habitat ordinaire pendant l'hiver.

Contrairement à ces observations immédiates faites par Hansen, il y a la déclaration de Pasteur, qui dit que les levures de vin *ne peuvent pas* rester en vie dans la terre pendant la période s'écoulant d'une saison à l'autre. Pasteur, toutefois, n'était pas à même d'indiquer la provenance des levures que l'on trouve sur les raisins à l'époque de la maturité des fruits.

Mycoderma cerevisiæ et vini.

Une particularité de ces espèces est qu'elles forment très facilement un voile sur différents liquides alcooliques. Les noms mentionnés embrassent une série d'espèces différentes, dont quelques-unes peuvent engendrer une légère fermentation alcoolique; elles se comportent de manières différentes dans leur action sur la bière de garde, quelques-unes provoquant des maladies, d'autres n'en provoquant point.

Le *Mycoderma cerevisiæ* (Fig. 54) étudié par Hansen, que l'on trouve d'une manière générale dans les brasseries de Copenhague, affecte des formes de cellules variées ; ces cellules sont ordinairement claires et moins réfringentes que celles des *Saccharomyces* proprement dits; dans chaque cellule on voit d'habitude 1,2 ou 3 petits grains très réfringents, qui prennent souvent un mouvement de vacillement et roulement. Ce microorganisme produit sur le moût et sur la bière un voile mat, grisâtre, fréquemment plissé, et n'engendre aucune fermentation alcoolique; il n'intervertit point des solutions de saccharose.

Fig. 54.

Mycoderma cerevisiæ des brasseries de Copenhague. Dessiné d'après nature par Holm.

Sur du moût de bière gélatiné, les *taches rompues sont d'un gris clair, mates, étendues en forme de voile ou excavées en forme de coupe.* Ces caractères microscopiques

permettent de distinguer facilement les Mycoderma des *Saccharomyces* ordinaires, qui produisent sur le même liquide des taches d'un gris jaune clair à surface sèche ou brillante et aux formes plus ou moins bombées. Il n'y a que le *Saccharomyces membranæfaciens* (page 207), dont les conditions biologiques sont très anormales et qui produit très rapidement une vigoureuse formation de voile sur la liquide, qui, dans les cultures sur plaques, se comporte essentiellement de la même manière que le Mycoderma.

Hansen constata la formation des voiles mentionnés ci-dessus, lorsqu'on abandonne de la bière à elle-même dans des verres sans couvercles, à des températures entre 2° et 15° C. Les voiles se développaient encore à 33° C., mais aux températures supérieures à 15° C, cette espèce est de plus en plus étouffée par les organismes concurrents. Comme c'est surtout aux basses températures qu'elle trouve des conditions favorables à son développement, elle se propagera facilement dans la cave de garde, d'autant mieux que pour elle la bière est un liquide nourricier bien plus favorable que le moût. Ceci fut le cas lorsqu'on introduisit des parcelles d'un voile pur dans des vases ouverts contenant de la bière et du moût, et que le tout fut abandonné à soi-même ; la culture dans la bière resta presque toujours pure, tandis que plusieurs espèces se présentèrent dans du moût.

Dans les recherches étendues que Hansen fit sur la bière de Carlsberg, il trouva toujours que ce champignon s'attaque tant à la bière de garde qu'à celle d'exportation ; mais on ne trouva jamais le moindre indice pouvant faire supposer que, pour cette raison, la bière fût atteinte d'une maladie quelconque. C'était précisément aux époques où la bière se distinguait par son inaltérabilité pour la conservation et son bon goût que le champignon était le plus répandu. Cela fut aussi le cas pour les nombreuses

recherches faites par MM. Grönlund et A. Petersen, ainsi que pour celles qui ont été exécutées dans le laboratoire de l'auteur. Il va sans dire, qu'il n'est question ici que de bière soumise à un traitement convenable. Dans des bouteilles et des fûts mal fermés, le *Mycoderma cerevisiæ* formera naturellement un voile, qui seul suffit déjà pour détruire le produit.

C'est M. Bèlohoubek qui, le premier, a trouvé que dans certains cas, le Mycoderma pouvait causer des dommages considérables dans les brasseries. Plus tard, M. Kukla nous a donné la description de troubles particuliers dans la bière de garde, qui se révélaient sous forme d'une fine poussière dans le liquide, soit déjà pendant le repos en cave, soit après le soutirage; il désigne le Mycoderma comme cause de cette maladie, et il admet en outre, que le moût faible à dix degrés (Ball.), ainsi qu'une certaine composition bien déterminée, étaient particulièrement favorables au développement du Mycoderma. Il faut espérer que de plus amples recherches jetteront plus de lumière sur ces matières.

Hansen avait déjà précédemment émis l'idée que le nom de *Mycoderma cerevisiæ* ne désigne pas seulement une seule, mais bien plusieurs espèces distinctes. Les recherches faites par M. Lasché confirment cela. Cet auteur nous donne la description de quatre espèces, qu'il a isolées de bières troubles. Elles se distinguent toutes de l'espèce décrite par Hansen en ceci que dans du moût de bière elles produisent de l'alcool, l'une 0,26 0/0 en volume, les deux autres 0,79 0/0 et la quatrième 2,51 0/0. De ses essais, M. Lasché conclut que les quatre espèces mentionnées produisent des maladies dans la bière, tant des troubles que des changements de goût et d'arôme; elles diffèrent donc aussi à ce point de vue-là du Mycoderma de Hansen. M. Lasché est porté à admettre que la composition chimique du moût n'a aucune influence sur

la maladie occasionnée par le Mycoderma, vu que dans le cours de ses essais, elle s'était présentée dans toutes sortes de moûts, qu'ils fussent riches ou pauvres en extrait, riches ou pauvres en sucre.

On a prétendu dans la littérature que l'action chimique de certaines espèces de Mycoderma consistait en une fermentation oxydante, qui se produisait à la surface de liquides vineux, et qui transformerait l'alcool dans certains cas en acide carbonique et en eau, dans d'autres cas en acide acétique. Elles seraient aussi capables de produire des acides sébaciques et de les oxyder, et enfin de produire des éthers (Schulz).

Dans la lie des foudres d'une brasserie, Lafar découvrit un mycoderma produisant la formation d'acide acétique.

Dans des recherches faites sur le *Mycoderma* que l'on rencontre sur le *vin,* Winogradsky trouva que dans des cultures pures préparées d'après la méthode de Hansen, *celui-ci change de forme suivant la composition du liquide nourricier*. Il avait fait ses expériences en partie avec des liquides dont les composants minéraux restaient constants, tandis que les matières organiques variaient, en partie avec des liquides présentant les conditions contraires.

Quoique de Seynes, Reess, Engel et Cienkowski crussent avoir trouvé des ascospores dans le Mycoderma, on ne réussit cependant plus tard pas à provoquer ces formations; les dessins qui existent font supposer qu'on aura pris pour des spores les globules gras que l'on trouve dans beaucoup de champignons unicellulaires pendant la période de repos ; dans certains cas, on a apparemment été induit en erreur par le mélange de véritables *Saccharomyces*. L'ancien nom de Mycoderma convient donc mieux à ce champignon que le nouveau de *Saccharomyces*.

CHAPITRE VI

APPLICATION PRATIQUE DES RÉSULTATS OBTENUS PAR LES RECHERCHES SCIENTIFIQUES.

Il est généralement reconnu que l'évolution de la fermentation joue un rôle très important dans toutes les branches de l'industrie de la fermentation. Les connaissances plus étendues, acquises peu à peu dans cette partie de l'exploitation, sont dues au développement de la science qui a pour objet l'étude des organismes de la fermentation. On a fixé ici trois grandes périodes.

Les travaux de la *première* période se rattachent tout à la grande question de savoir si des êtres vivants peuvent naître par *génération spontanée (generatio spontanea v. æquivoca)*. La *seconde* période est marquée par les travaux classiques de Pasteur. La *troisième* période, qui date de 1879, dans laquelle seulement une réforme a été accomplie, a été créée par E. Chr. Hansen.

1. La période la plus ancienne (1745-1857) a fourni *la théorie et posé les bases de la technique de la stérilisation* (voir p. 13).

Les découvertes de Spallanzani sur la génération spontanée ont non-seulement formé le point de départ de la bactériologie moderne (voir p. 13-14), mais elles ont encore eu une influence magistrale sur la vie pratique. En 1782, Scheele fit connaître que par le chauffage on

pouvait conserver le vinaigre sans qu'il s'altérât, et Appert montra (1810) que la bière, le vin et d'autres liquides pouvaient être rendus propres à la conservation par un traitement analogue. De plus il avait été démontré que l'air pouvait être purifié en étant chassé à travers des tubes rougis (Schwann), ou des filtres en coton (Schröder et Dusch). On avait par là également obtenu le résultat que l'eau pouvait être purifiée par un traitement analogue, pourvu que les filtres fussent suffisammest épais. En 1839, Schwann fit déjà observer que les cellules de levures étaient tuées par certains produits chimiques, et qu'en même temps la fermentation s'arrêtait. Ainsi fut posée la base de la théorie des *antiseptiques*.

2. La période de Pasteur commence avec l'année 1857. Le grand mérite de ce savant est d'avoir prouvé que les *bactéries* exercent une action nuisible sur les différentes fermentations, et qu'elles peuvent provoquer des maladies dans les liquides ayant à subir une fermentation alcoolique.

On doit donc diriger le travail de telle sorte que des infections de ce genre soient écartées, et le meilleur moyen est d'empêcher l'air impur d'avoir accès vers les liquides. La conséquence de ce principe est en particulier pour la brasserie la suppression des bacs et des réfrigérants ouverts, l'aération du moût par de l'air purifié, et la purification de l'air dans les locaux servant à la fermentation.

Les observations relatées dans le chapitre VII des « *Études sur la bière* » (1876), sur l'importance de *l'oxydation du moût* pendant le refroidissement, ont également une grande importance pratique. Par des mesures directes de la quantité d'oxygène contenue dans le moût, Pasteur fait voir, qu'une certaine quantité d'oxygène, soit libre, soit en combinaison dans le moût,

exerce une influence sur la marche de la fermentation et sur la clarification, mais que lorsque la quantité d'oxygène contenue dans le moût dépasse une certaine limite, cela peut nuire au caractère (force et arôme) de la bière (p. 377).

Malgré les recherches étendues de plusieurs de ses successeurs dans ce domaine, il n'a pas été possible, jusqu'à présent, d'établir des règles définitives d'après lesquelles on puisse travailler dans la pratique. Dans chaque cas particulier, on est obligé de procéder par voie d'expérience.

Pasteur reprit les méthodes de Scheele et d'Appert pour le traitement du vinaigre, du vin et de la bière à des températures plus élevées et, grâce à sa grande autorité, il leur assura un champ d'application étendu (la *pasteurisation*). Récemment, surtout depuis que Koch a fait voir combien le bacille de la tuberculose est répandu, le lait a également été traité par cette méthode.

Les *expériences d'aération* décrites dans les « *Études sur la bière* », entraînèrent un grand nombre de recherches qui ont fourni des données précieuses sur la *puissance fermentative et reproductive* de la cellule de levure, lorsqu'elle est en présence de quantités d'oxygène variables. Ces choses jouent un grand rôle dans la *distillerie* et dans la *fabrication de la levure pressée*. On n'est cependant pas encore fixé sur l'emploi pratique de ce procédé.

La raison pour laquelle le procédé proposé par Pasteur, pour la purification de la levure, n'a pas pu acquérir une importance réelle, a été indiquée précédemment (page 31).

3. Avec les travaux de Hansen sur les ferments alcooliques commença, comme M. Aubry le dit avec raison, une nouvelle vie dans l'industrie de la fermentation.

En 1883, Hansen démontra que les troubles de la levure, si généralement redoutés, ainsi que les désagréables altérations du goût et de l'arôme, et qu'en général quelques-unes des *maladies de la bière* les plus fréquentes et les plus dangereuses, avaient leur source, non pas dans les bactéries, dans l'eau, dans le malt, dans le mode de brassage, etc., comme on le croyait alors, mais bien *dans la levure elle-même*, attendu que dans ces cas, le levain contient, à côté de la race de culture, *d'autres* espèces de *Saccharomyces qui constituent des ferments de maladie (Sacch. pastorianus I* et *III, Sacch. ellipsoideus II). Ceci établit la base du nouveau système.*

Ensuite il montra que *sous le nom de Saccharomyces cerevisiæ, on devait comprendre un grand nombre d'espèces ou de races différentes — tant de fermentation basse que de fermentation haute* — pouvant communiquer à la bière des propriétés très différentes.

Sur ces recherches scientifiques se base, comme conséquence immédiate, le troisième article de son nouveau système : sa méthode pour la *culture pure de la levure.* S'il était possible de faire disparaître dans une masse de levure impure, les levures sauvages, les bactéries et les moisissures, le but ne serait cependant pas entièrement atteint. *Si une levure purifiée de la sorte contient plusieurs espèces de Saccharomyces cerevisiæ, il résulte de ce qui précède, que l'on travaillera aussi peu sûrement qu'avant la purification*, et il faut encore ajouter à cela, *qu'un pareil mélange est toujours soumis, pendant les fermentations, à des fluctuations dans les proportions de ses éléments constituants.* De nouvelles recherches de Hansen ont même montré qu'il existe des cas où deux races de levure qui, prises isolément, donnent un produit irréprochable, peuvent, lorsqu'elles sont mélangées, *occasionner des maladies dans la bière.*

Hansen en fit l'expérience avec les deux espèces de levure basse de Carlsberg, n° 1 et n° 2 (page 214) ; il prit tantôt le n° I comme masse principale du levain en y ajoutant du n° II en plus faible quantité, tantôt il fit l'inverse. Il arriva, dans tous les cas, que l'espèce inférieure en quantité (soit I soit II) rendait la bière moins propre à la conservation, en ce qui concerne le trouble de levure, que si la fermentation ne résultait que de l'espèce dominante employée seule. L'une ou l'autre de ces espèces, employée dans ces conditions, *avait joué le rôle d'une levure de maladie* (par exemple *Sacch. past. III.* et *Sacch. ellipsoideus II*). On n'obtient vraiment donc, de la *régularité dans la fabrication, qu'en choisissant méthodiquement la race convenable, éliminée de la masse de levure et propagée isolément* (Voir l'exposé détaillé p. 37-38).

Les études méthodiques de Hansen sur la *constance des caractères des différentes espèces de levures*, qu'il poursuivit pendant plusieurs années, ont démontré que dans les conditions où elles se trouvent ordinairement dans les brasseries, elles ne manifestent que des variations insignifiantes qui n'ont aucune importance pratique. Ces résultats ont été confirmés par différents auteurs.

Il réussit par contre, par une action méthodique plus énergique sur les conditions vitales des espèces de levure, *à produire des variétés* (voir page 177), qui restèrent constantes à différents degrés, jusqu'à celles qui présentèrent le caractère d'espèces nouvelles. Un résultat de ces travaux de Hansen fut la préparation qu'il fit de variétés appropriées de quelques levures industrielles.

Les caractères distinctifs biologiques et physiologiques des espèces ont permis à Hansen de trouver en même temps une *méthode d'analyse pratique pour la levure*

de brasserie (page 157), qui permet de se préserver à temps de l'invasion de levures étrangères. Il a déja été démontré précédemment par ses expériences, faites en grand, que les espèces qui troublent la bière pouvaient se trouver dans le levain, dans la proportion de 1/41, et que la levure (*Sacch. pastorianus I*) qui donne à la bière une odeur désagréable et une mauvaise amertume pouvait atteindre dans le levain la proportion de 1/22, sans exercer une influence préjudiciable, si la fabrication est régulière. Au moyen de la méthode analytique de Hansen, on peut (d'après les expériences de MM. Holm et Poulsen) constater avec certitude la présence d'un mélange de levures sauvages de 1/200 de la masse totale.

Il résulte des nombreuses analyses exécutées d'après cette méthode, que *les signes qu'autrefois l'on considérait généralement comme caractéristiques pour une fermentation normale, ne suffisent pas* pour révéler la présence des ferments de maladie, attendu que la couche qui recouvre le liquide, ainsi que l'atténuation, la cassure et la clarification peuvent être satisfaisantes, malgré que la levure soit fortement infectée par des germes de maladie.

Il est évident que la question de savoir combien de temps une culture pure pouvait conserver son état de pureté primitif dans la pratique, ne peut être résolue d'une façon générale. Hansen a trouvé que les diverses races possèdent des *pouvoirs de résistance différents* à l'égard des infections; et de plus une seule et même race ne pourra pas, pendant le même espace de temps, se conserver pure dans des locaux de fermentation inégaux. Nous savons que la saison joue un rôle, et que les périodes de l'année où les levûres sauvages, les bactéries et les moisissures abondent dans l'air, sont surtout dangereuses. On sait que l'infection peut éga-

lement avoir lieu à d'autres époques de l'année, surtout par les ustensiles. Les bacs refroidisseurs ouverts sont la voie par laquelle, en général, les germes de maladie pénètrent dans l'exploitation; une autre source d'infection se trouve dans la lie des tonneaux. *La manière dont une brasserie s'inocule sans doute le plus fréquemment les germes de maladies est, sans contredit, l'emprunt de levain à une autre brasserie. Seul l'emploi de cultures absolument pures présente une sûreté véritable.* L'analyse nous révèlera toujours l'infection longtemps avant qu'elle ne soit devenue dangereuse, et l'on sera donc à temps pour introduire une nouvelle culture pure de la même levure. On travaillera naturellement avec une sécurité bien plus grande en employant d'une manière suivie l'appareil à propager la levure, qui est décrit plus loin. Le résultat principal se résume en ceci, *qu'aujourd'hui on ne travaille plus au hasard et que l'on n'est plus forcé d'y abandonner ses fermentations, comme c'était le cas autrefois.*

Comme les différentes races de levure ne sont pas également résistantes contre les germes de maladie concurrents, il est, dans bien des cas, très important de pouvoir introduire, à de courts intervalles, d'assez fortes quantités de levure pure dans l'exploitation, une fois que la race convenable aura été choisie par des essais méthodiques. On se sert, dans ce but, de *l'appareil à propager la levure*, construit par MM. Hansen et Kühle, qui, une fois pourvu d'une culture pure, peut fonctionner sans interruption pendant des années entières. L'appareil (Fig. 55), dont Hansen donne dans son livre « Recherches faites dans la pratique de l'industrie de la fermentation (contributions à la biologie des microorganismes) » [1]

(1) En français, dans le compte rendu des Meddelels. fra Carlsberg Laborat., Copenhague. En allemand chez Oldenbourg, Munich (voir la bibliographie). Dans cet ouvrage, il a donné en général, un exposé de tout son système.

une description détaillée avec la manière de s'en servir,

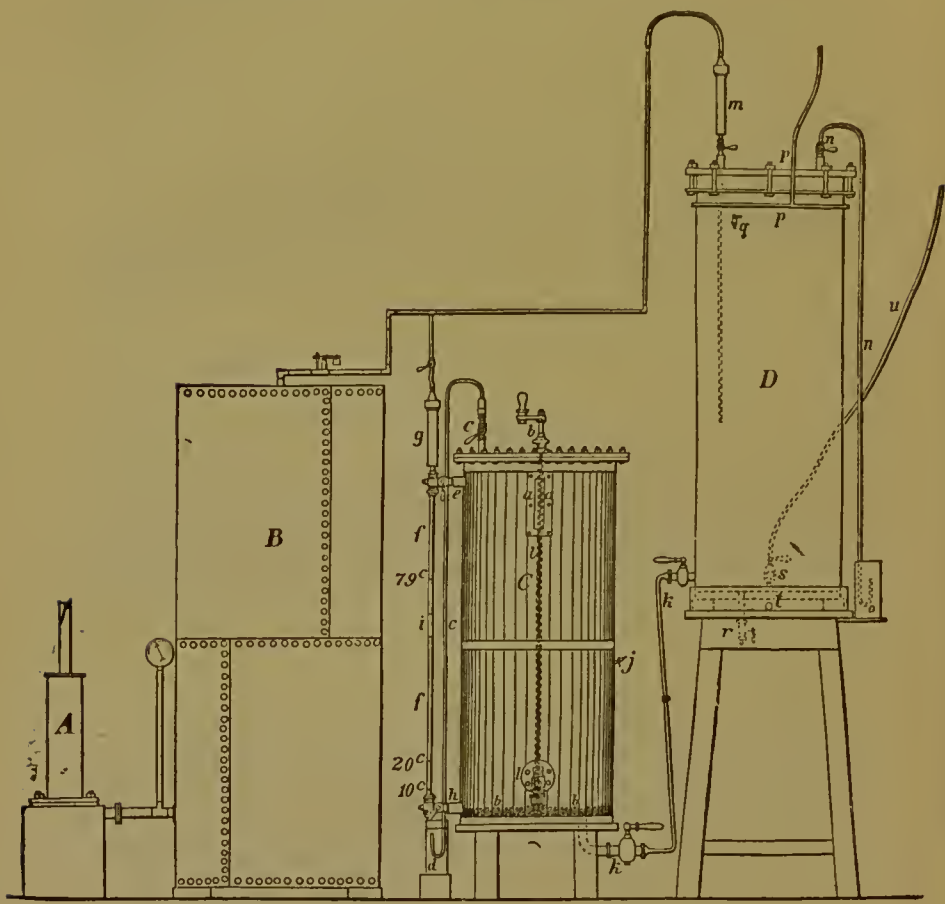

FIG. 55.

Appareil à propager la levure, construit par Hansen et Kühle.

A *Pompe à air*, B *réservoir à air*, C *cylindre à fermentation* : **a** fenêtre, **bbb** agitateur, **cc** tube recourbé deux fois, **d** vase contenant de l'eau, **i** robinet de soutirage ; **ff** tube en verre relié avec le cylindre par les tubes **e** et **h**, et muni de marques pour mesurer des quantités déterminées de liquide, **g** filtre, **i** tube en caoutchouc intercalé dans le milieu du tube en verre, **j** tube servant à introduire la culture pure, **kk** communication avec **D**, le *cylindre à moût* : **m** filtre, **nn** tube recourbé deux fois, **o** récipient contenant de l'eau, **pp** tube rafraîchisseur, **u** conduite du moût avec robinet **s**, **t** tube d'écoulement pour l'eau de refroidissement, **q** robinet (on laisse monter le moût jusqu'à ce robinet), **r** robinet de soutirage.

se compose de trois parties principales et de tubes qui les relient les unes aux autres. Nous avons : 1. la partie pour l'aération, qui se compose de la pompe pneumatique (*A*) et du réservoir à air (*B*) ; 2. le cylindre à fermentation (*C*), et 3. le cylindre qui reçoit le moût (*D*).

L'air, purifié en partie par un avant-filtre, est refoulé dans le réservoir à air et peut être conduit de là dans le cylindre à moût ou dans celui à fermentation. Dans les deux cas, l'air est conduit par des filtres à coton stérilisés (*g*, *m*). Le *cylindre à moût* communique directement par une conduite avec une chaudière à cuisson dont il reçoit le moût houblonné bouillant, qui entre alors en contact avec l'air dans le cylindre clos, et qui est refroidi par de l'eau qui coule à l'extérieur sur les parois du cylindre. Ensuite on fait passer ce moût, préparé à recevoir la levure, dans le *cylindre à fermentation*. Celui-ci, comme le cylindre à moût, est construit d'après le même principe que les ballons ordinaires à deux tubulures. Il est muni d'un tube recourbé en deux endroits (*c d*) qui plonge dans un réservoir à eau, d'un tube en verre vertical (*f i f*) permettant de mesurer la hauteur du liquide contenu dans le cylindre, d'un agitateur (*bb*) pour mélanger la levure déposée avec le moût, et d'un robinet de sortie (*l*) pour la bière et la levure, construit spécialement dans ce but. Il se trouve, environ au milieu du cylindre, un petit tube latéral (*j*) avec serpentin, pince à vis et bouchon en verre. Quand une partie du moût a pénétré dans le cylindre à fermentation, on introduit par le serpentin en (*j*) la levure absolument pure, qui est expédiée à la brasserie dans un ballon spécialement construit pour cet usage ; ensuite on rebouche le serpentin et l'on peut ajouter, immédiatement ou au bout de quelques jours, suivant la quantité de levure que l'on a introduite, ce qu'il reste encore de moût.

Si l'appareil a été placé dans un local où il est né-

cessaire de régler la température pendant la fermentation, on devra entourer le cylindre à fermentation d'une enveloppe en cuivre.

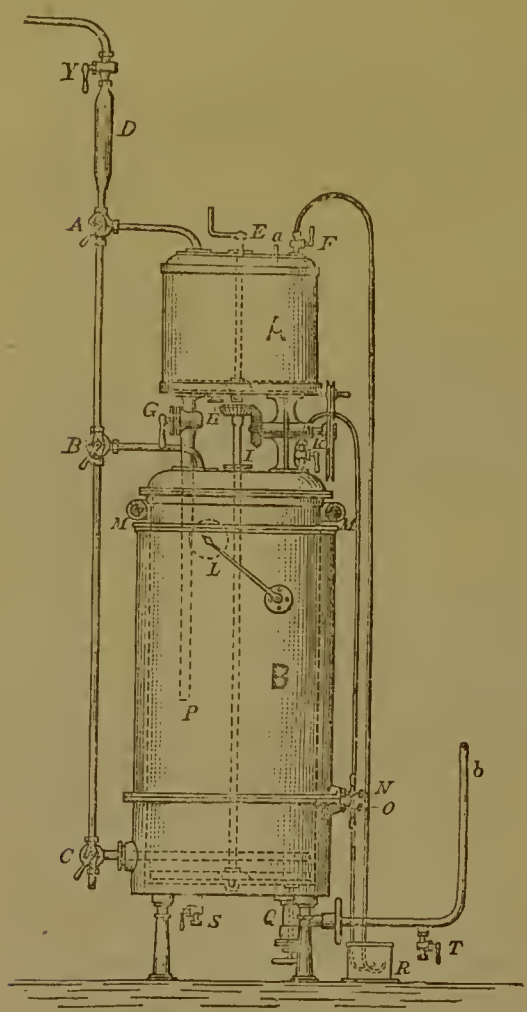

Fig. 56.

Appareil propagateur construit par Bergh et Joergensen.

Ce simple appareil permet de produire, en très peu de temps, de la levure absolument pure pour environ 8 hectolitres de moût. Une fois en marche, l'appareil fonctionne indéfiniment. Nous renvoyons d'ailleurs à la description détaillée qui se trouve dans l'ouvrage de Hansen, mentionné plus haut.

MM. Bergh et Joergensen ont apporté une modification de l'appareil propagateur (Fig. 56). L'air filtré est amené par les robinets à trois voies : en *A*, *B* et *C*, dans les deux cylindres **A** et **B**. Le cylindre du haut contient environ 10 litres, celui du bas 160 litres. *A* est muni d'un agitateur (*E*), d'un tube (*a*) servant à l'intro-

duction de la levure et au soutirage des échantillons. Le tube recourbé *F* sert de tube d'échappement pour l'acide carbonique. Les deux cylindres sont reliés l'un à l'autre au moyen du tube *GP*. Cette communication peut être établie ou interceptée par le robinet *G*. *H* est l'échappement de l'eau de lavage, lorsque le cylindre *A* a été nettoyé.

Le cylindre *B* est enveloppé d'un manteau en fonte partagé en deux. Au moyen d'eau circulant dans le manteau supérieur, le moût peut être refroidi et la fermentation réglée; le manteau inférieur sert d'enveloppe pour la vapeur, avec un robinet en *O*, pour l'entrée, et un autre en *S*, pour la sortie de la vapeur. *M* est un tube en forme d'anneau, muni de petits trous; pendant le refroidissement du moût, il communique avec une conduite d'eau froide. L'eau est soutirée en *N*. L'agitateur I est actionné par un système de rouages. Un flotteur à aiguille et arc *L* indique la hauteur du liquide dans le cylindre. Du couvercle part le tube recourbé *K*. Le robinet Q adopté au fond est en communication avec le tube de conduite *b* (avec le robinet *T*). Les deux tuyaux recourbés aboutissent au récipient *R* qui est rempli d'eau.

Le moût s'introduit dans le cylindre inférieur, où il est traité de la manière ordinaire. La culture pure est mise dans le cylindre supérieur, d'où elle est entraînée par un peu de moût dans le cylindre inférieur, et d'ici on fait passer ce moût dans le cylindre supérieur et ensuite de nouveau dans **B**. Quand il s'est produit dans ce dernier un vigoureux développement de levure, on agite le liquide et on presse une partie du liquide fermentant dans **A**, pour l'utiliser dans la prochaine fermentation. Le cylindre **B** est donc alternativement cylindre à fermentation et cylindre à moût (1).

(1) Les appareils décrits plus haut ont tous deux été construits par MM. Burmeister et Wain, à Copenhague; l'appareil de Hansen et Kühle, par M. W. E. Jensen, chaudronnier dans la même ville.

D'autres modifications ont été apportées par MM. Brown et Morris, Elion, Kokosinski et van Laer; les appareils construits par MM. P. Lindner et Marx diffèrent davantage (1).

Pour pouvoir faire l'expédition de la culture pure méthodiquement choisie, à l'état liquide, Hansen a imaginé un ballon spécial. Ces ballons permettent d'envoyer la levure fort loin, et il n'y a aucune difficulté à la transvaser sans danger dans le cylindre.

Pour expédier de petites quantités des cultures absolument pures, de manière à ce qu'elles puissent facilement et sûrement se multiplier, on se sert des petits *flacons de Hansen* (p. 25). On les relie dans la flamme au ballon Pasteur, ayant servi au développement de la culture pure. On porte une trace de la levure sur le coton dans le flacon, et on rebouche celui-ci dans la flamme avec un bouchon en amiante, que l'on enduit de cire à cacheter. Quand on veut se servir de la culture pure on remet le

(1) Un appareil servant dans l'industrie de la fermentation, qui n'a obtenu qu'aujourd'hui l'importance réelle d'un instrument dans le système de culture pure de la levure de Hansen, est *l'appareil réfrigérant clos*, mentionné déjà précédemment, qui permet d'introduire le moût dans les cuves de fermentation, à l'état de pureté absolue, et chargé de la quantité d'air convenable. Des appareils spécialement aménagés dans ce but ont été construits par M. Velten, peu après la publication des «Études» de Pasteur, et d'après les données théoriques de Pasteur. Ils n'ont cependant pas obtenu jusqu'à aujourd'hui une réelle importance pratique; car à quoi cela servait-il d'avoir un moût pur, du moment qu'on y semait avec la levure des germes de maladie? Indépendamment de cela, les appareils de M. Velten sont d'une construction peu heureuse, l'air se stérilisant par le passage à travers des tubes rouges. Une disposition excellente se trouve par contre dans « *l'appareil de Carlsberg* ». Ce n'est que maintenant, que l'on a la levure pure, que l'utilité de tels appareils apparaît distinctement, et à l'avenir les bacs ouverts tendront par conséquent à disparaître.

petit flacon en communication avec un ballon Pasteur contenant du moût, dans lequel on introduit la levure. On rince alors avec du moût contenu dans le ballon Pasteur la levure qui se trouve sur le coton, pour l'amener ainsi dans le ballon lui-même.

Ce procédé a donné de bons résultats, en particulier pour l'expédition des cultures pures dans des contrées tropicales. Sans cela il eut, dans bien des cas, été impossible d'en envoyer en Australie, dans l'Amérique du Sud et dans les contrées les plus éloignées de l'Asie (1).

Il est de la plus haute importance que, même au bout de plusieurs années, on *puisse toujours avoir à sa disposition, exactement la même levure dont on avait fait choix*, en la conservant au laboratoire, pure, dans une solution à 10 pour cent de saccharose (page 25). Dans une telle solution, les levures de culture restent en vie pendant plusieurs années, sans altération de leurs qualités.

Pour ce qui concerne la conservation des microorganismes dans des milieux solides (des gélatines), M. Percy Frankland a trouvé que les bactéries de fermentation sont sujettes à perdre plus ou moins complètement leur puissance fermentative, lorsqu'elles sont cultivées d'une manière suivie dans un milieu solide. Quelquefois la puissance fermentative disparaît après une seule culture sur plaques.

Les cultures en masse absolument pures de races de

(1) L'expédition d'échantillons de levure dans du papier à filtrer stérilisé, a un tout autre but. On emploie ce procédé soit pour envoyer une levure impure de brasserie à un laboratoire, afin d'obtenir de cet échantillon une culture pure, soit pour faire parvenir commodément à destination une culture pure dans une enveloppe de lettre. Mais il est évident que de cette manière on n'est plus en présence d'une culture absolument pure, sur laquelle on puisse compter ; cet échantillon ne peut donc servir que comme point de départ pour une nouvelle culture pure.

levure choisies méthodiquement et préparées pour l'industrie, sont entrées maintenant, depuis que Hansen a fait, en 1883, ses premiers essais dans la célèbre brasserie du Vieux-Carlsberg, à Copenhague, dans de nombreuses brasseries de tous les pays où se fabrique de la bière, non-seulement en Europe, mais aussi en Amérique, en Asie et en Australie.

Le *système de Hansen* ayant été développé en premier lieu dans la *fermentation basse de la brasserie*, il devait nécessairement trouver sa *première application* dans des brasseries de ce genre. Aussi a-t-il atteint ici le plus haut degré de perfection, et *quiconque désire se familiariser avec l'emploi de ce système*, dans l'une ou l'autre branche de l'industrie de la fermentation, *devra, par conséquent, toujours commencer par étudier les résultats obtenus dans la fermentation basse de la brasserie.*

La *brasserie de fermentation haute* a, par la suite, mis à profit ce progrès, et l'on a vu que ce système présente ici les mêmes avantages. On avait d'abord aussi soulevé ici les mêmes objections que contre l'emploi de la levure pure de fermentation basse, à savoir qu'elle ne pouvait pas produire de fermentation secondaire, celle-ci ayant besoin pour se former des espèces de levures dites sauvages. Mais, dans le cas présent, pas plus que dans d'autres, l'objection n'a pu prévaloir contre l'expérience et les essais pratiques. Ce qu'il y a d'incontestable, c'est qu'il existe des espèces de levure haute, qui peuvent provoquer une fermentation secondaire énergique, et d'autres, qui n'en sont capables qu'à un degré bien inférieur. Il est donc nécessaire de *choisir méthodiquement parmi les espèces, celle* qui puisse remplir les conditions exigées.

La réforme a pris une extension de plus en plus grande, et le nouveau système fait son chemin dans les

distilleries, dans la *fabrication de la levure pressée* et dans les différentes *fermentations du vin*.

Les recherches de Hansen qui firent époque ont, cela va sans dire, fait naître dans ces dernières années, une littérature très importante. En résumé, cette littérature peut être classifiée en trois points de vue distincts : En ces mémoires éphémères n'ayant évidemment pour but unique que de faire opposition aux travaux du savant danois, et de mettre des obstacles à l'introduction de cette réforme dans la science et dans la pratique ; en mémoires qui abordent le sujet, mais qui accusent des malentendus sur les différents articles ou sur la base fondamentale du système; et enfin en un groupe d'ouvrages de valeur, se proposant d'éclaircir différents points du système, et d'en faciliter ainsi l'intelligence exacte et l'emploi pratique.

Cela nous entraînerait trop loin de passer en revue ces différentes parties de la littérature. Nous nous bornerons ici, pour terminer cet exposé, à citer quelques paroles des autorités les plus compétentes, qui, en éclairant la question de différents côtés, ont acquis un mérite incontestable pour l'introduction du système dans les différents pays.

M. le professeur Dr C. Lintner donne l'aperçu suivant sur l'état des choses en 1885 (1).

Depuis que plusieurs brasseries ont employé les races de levure de Carlsberg, cultivées à l'état de pureté, et depuis que la Station Scientifique de Munich a, elle aussi, introduit dans les brasseries de la levure de cultures pures provenant de levures de Munich, les résultats obtenus peuvent être résumés comme suit :

1. La contamination d'une levure, d'ailleurs normale, par des levures dites sauvages, peut la rendre peu à peu

(1) Zeitschrift für das gesammte Brauwesen, p. 399, 1885.

impropre à la fabrication d'une bière de bon goût et facile à conserver.

2. Une contamination de ce genre peut se produire par les levures sauvages suspendues dans la poussière de l'air en été et en automne, ou par l'introduction d'autres levures, ou par la lie des bacs.

3. La méthode d'analyse et de culture pure de Hansen permet d'isoler d'une levure contaminée la levure de brasserie que l'on désire avoir à l'état de pureté.

4. La levure de culture possède à un haut degré les qualités de la levure originale avant sa contamination, tant sous le rapport du degré d'atténuation, que sous celui du goût et de la facilité de conservation des bières en question.

5. Il existe plusieurs variétés de la levure basse normale (*Sacch. cerevisiæ*), jouissant de propriétés spécifiques qui restent fixes, et constituent les particularités de la race.

M. le professeur Aubry, directeur de la Station Scientifique de brasserie à Munich, écrit en 1885 [1] : « Outre les brasseries mentionnées (Spatenbräu et Leistbräu, Munich), un grand nombre de brasseries du pays et de l'étranger avaient reçu de la levure pure de Carlsberg, et s'en étaient servi comme levain à titre d'essai. Bien entendu les résultats que l'on avait attendus n'avaient pas été atteints partout, le degré de fermentation fut, dans la plupart des cas, trouvé trop bas [2], le goût n'était pas celui que l'on aimait généralement dans l'endroit etc., *mais tous les rapports dont nous avons pu avoir connaissance étaient favorables en ce qui concerne la conservation facile, la limpidité et l'absence du goût de levure.*

(1) Zeitschrift für das gesammte Brauwesen, 1885.

(2) Levure basse n° 2 de Carlsberg, une espèce clarifiant rapidement.

Les bonnes qualités de cette levure ont en outre décidé plusieurs brasseries de l'introduire à demeure, ainsi la brasserie de Liesing, près Vienne. Pendant la saison de brassage actuelle, la brasserie de Spaten, à Munich, a utilisé sur la plus grande échelle, de la levure provenant de Carlsberg, et pareillement dans la brasserie du Franziskanerkeller, à Munich, une grande partie des levains employés pendant l'hiver provenait de cultures pures de Carlsberg. La marche de la fermentation et les résultats concernant le goût, la mousse et la conservation des bières répondaient à toutes les exigences. L'atténuation un peu basse semble relever du caractère de la levure, attendu qu'elle reste constante. Le goût des bières diffère au commencement quelque peu du goût ordinaire des bières de Munich, dans les générations ultérieures il s'en rapproche cependant un peu, tout en restant moelleux et agréable. »

M. le docteur Will, chef de laboratoire, écrit en 1885 (1) « Si donc il est possible, comme je crois l'avoir prouvé, de reconnaître sûrement les espèces de levure qui sont dangereuses pour la brasserie, nous devons ici tirer profit de cette découverte pour la pratique, et n'employer que des levains qui ne présentent pas les caractères indiqués propres aux espèces nuisibles, et qui causent souvent des troubles des plus préjudiciables dans la fabrication. Mais ceci ne sera possible que lorsque les cellules de levure, possédant les qualités de la levure basse normale, seront isolées des levains de brasserie ordinaires, et cultivées dans des conditions qui excluent toute contamination, autrement dit, *lorsque des levures de culture pure seules*, seront employées dans la fabrication. C'est à Hansen que revient aussi, dans cet ordre de choses, le grand mérite d'avoir tracé le chemin, et d'avoir élaboré

(1) Allgemeine Brauer-und Hopfenzeitung, 1885.

une méthode permettant d'atteindre le but proposé. Les succès éminents qui ont été obtenus au Vieux-Carlsberg avec la levure de culture pure, ont déjà engagé beaucoup de brasseurs à travailler avec de la levure pure, et en général les résultats ont été satisfaisants, pourvu que les races aient été choisies de manière à être identiques avec la levure basse normale, sous le rapport du degré de fermentation et du goût.

Puisse, par conséquent, la connaissance de la valeur de la levure de culture pure pénétrer de plus en plus dans le monde de la brasserie et anéantir ainsi maint préjugé contre la levure pure ; puissent aussi les petites brasseries qui, abstraction faite de cela, ont à combattre bien des difficultés, être bien convaincues qu'avec l'introduction de la levure de culture pure dans une brasserie, bien dirigée d'ailleurs, on parvenait à vaincre une série de calamités. Les frais qu'on aura eu à supporter ne seront pas sans porter des fruits en abondance.

M. le docteur Reinke, chef de laboratoire à la station d'essai pour la brasserie à l'école agricole supérieure de Berlin, donne, en 1888, à l'état des choses une expression significative de la manière suivante (1):

« Sans l'étude exacte des travaux fondamentaux de Hansen et sans en faire l'application, personne n'est à même aujourd'hui, de supporter à la longue la concurrence en brasserie. Les travaux de Hansen ont amené une révolution dans l'exploitation de la brasserie, en particulier dans le traitement de la levure. »

M. le docteur Bélohoubek, professeur à l'école polytechnique de Bohême, à Prague, écrit dans sa biographie bien connue de Hansen, en 1889 (2) :

(1) Chemiker-Zeitung, 29 décembre 1888, p. 1749.

(2) Zeitschrift f. d. ges. Brauwesen, Munich, 1889, p. 505. — *Manuel du brasseur*, 1891.

« Personne ne s'étonnera que l'établissement du principe de la culture pure de la levure et la critique vraiment anéantissante de l'évolution de la fermentation, qui ne dépendait que du hasard, telle qu'elle était généralement pratiquée jusqu'ici, et avant tout que l'introduction de la levure de culture pure dans la brasserie ait soulevé dans les rangs des praticiens, à part quelques exceptions dignes d'éloges, d'abord de l'étonnement, puis de la gaieté, et finalement une opposition exaspérée. Quiconque est du métier, sait quel esprit conservateur entêté il existe dans le monde brassicole, où l'on montre non-seulement de la méfiance et de la passivité envers toutes les innovations et idées réformatrices, mais où on leur oppose souvent la résistance la plus opiniâtre. Heureusement que plusieurs circonstances importantes s'allièrent pour aider à combattre cette opposition, dont finalement on triompha, malgré le concours empressé que lui avaient prêté quelques savants spécialistes, surtout dans l'Allemagne du Nord et dans l'Autriche-Hongrie. Ce qui contribua essentiellement à la victoire des idées de Hansen, ce fut leur justesse, qui fit que les premières autorités de l'Europe, en matière de la zymotechnie, les accueillirent avec une pleine conviction ; ce fut ensuite le fait, qu'aussi en dehors du Danemark, des spécialistes sérieux commencèrent à s'occuper de la culture pure de la levure ; troisièmement, ce furent les résultats excessivement favorables, qui furent obtenus avec la levure pure dans la pratique de la brasserie ; et enfin ce fut la circonstance, que le docteur Hansen parvint en 1887, avec l'aide de M. Kühle, directeur de la brasserie du Vieux-Carlsberg, à construire un appareil pour la culture pure, permettant la production en masse des quantités de levure pure, relativement petites, obtenues dans les laboratoires. — Aujourd'hui, des centaines de brasseries tirent une levure mère de culture pure de laboratoires, qui s'occupent de

la culture pure de levure de bière, et des milliers de brasseries le font indirectement, en faisant venir à leur tour leurs levains de ces établissements. *L'introduction générale de la levure pure en brasserie n'est donc aujourd'hui plus qu'une question de temps.*

Si l'on examine dans toute son objectivité, l'importance de ce fait, en l'appliquant aux conditions du travail dans les brasseries de fermentation basse de l'Europe, on ne pourra guère s'empêcher de reconnaître que la réforme inaugurée par Hansen a une portée bien plus grande, que cela n'est en général admis. Une conséquence de cette réforme se discute déjà parmi les hommes compétents, à savoir la suppression des bacs refroidissoirs dans toutes les brasseries travaillant avec de la levure pure, pour la raison que ces appareils permettent une forte infection du moût par des microorganismes en général. et surtout par des bactéries et par des espèces de levure dites « sauvages ». Aussi c'est avec raison que l'on a proposé une filtration des moûts houblonnés, ou telle autre méthode permettant d'éliminer les matières qui provoquent des troubles (c'est-à-dire la lie des bacs), suivie d'une saturation avec de l'air filtré et d'un refroidissement artificiel. Malgré cela, toutes les mesures de précaution à prendre pour éviter une nouvelle infection du moût dans le local de la fermentation et dans la cave de garde ne sont nullement encore épuisées. Ce ne sera que lorsque ces nouveaux problèmes auront été résolus d'une manière satisfaisante, peut-être par l'introduction de vases à fermentation clos, formés d'une matière convenable, par la stérilisation des cuves de fermentation et des foudres de garde, par une installation plus rationnelle des caves de fermentation et de garde, par la ventilation de ces locaux au moyen d'air filtré, etc., ce n'est qu'alors qu'on pourra jouir pleinement, tant dans le monde des producteurs que dans celui des consommateurs, de tous les

grands avantages qu'il y a d'obtenir une bière de meilleure qualité et d'une conservation facile, avantages qui sont la conséquence de l'emploi de la levure pure.

Ce qui vient d'être indiqué dans les lignes précédentes sur l'importance de la levure de culture pure, ne se rapporte uniquement qu'à la levure de fermentation basse. *A priori* il n'y avait nullement lieu de douter que la méthode de Hansen pour la culture pure de la levure ne pût être appliquée avec le même succès à la levure de bière de fermentation haute. La justesse de cette supposition a été depuis prouvée expérimentalement par Alfred Joergensen, et la levure pure haute peut être appliquée dans l'art brassicole avec le même succès que la levure pure basse. L'auteur de ces lignes a la conviction qu'on devait obtenir de grands avantages pour les distilleries, et surtout pour les fabriques de levure pressée par l'introduction de races de levures cultivées à l'état de pureté absolue. Dans les distilleries on aurait — toutes choses égales d'ailleurs — des atténuations plus favorables et un plus grand rendement d'alcool, en comparaison des résultats moyens pouvant être obtenus jusqu'à présent, tandis que dans les fabriques de levure pressée, le choix convenable des levures de culture pure permettrait d'atteindre un plus grand rendement en levure pressée. Dans cette dernière industrie, l'emploi de trempes claires serait peut-être préférable à celui des trempes chargées de drèches usité jusqu'ici ».

Dans le mémoire de M. H. Bungener « la levure de bière » 1890 (1), il se trouve la remarque suivante sur le contraste entre l'ancienne et la nouvelle période: « En France, le système de Hansen a été préconisé par MM. L. Marx, A. Flühler et Kokosinski. Appliqué dans

(1) *Moniteur scientifique* du Dr Quesneville, juillet-août, Paris, 1890.

quelques brasseries — depuis peu de temps, il est vrai, — il est sur le point de l'être dans d'autres. Nous sommes persuadé qu'en France, comme partout ailleurs, son adoption dans toutes les usines de quelque importance n'est plus qu'une question de temps. Il est hors de doute, en effet, qu'il assure la réussite et la régularité d'une des phases les plus importantes de la fabrication, dont le succès était précédemment subordonné dans une large mesure aux caprices du hasard. »

M. le docteur C. J. Lintner, professeur à l'école polytechnique de Munich, écrit en 1891 (1) : « Dans les rapports sur les progrès réalisés en brasserie, il a été question, à plusieurs reprises, des célèbres recherches du savant danois Emile Christian Hansen et de leur application pratique. Dans ce journal, il n'a pas été donné jusqu'à présent d'exposé complet des réformes et des méthodes dues à Hansen, et cependant cela serait à désirer, eu égard à l'importance éminente qu'elles ont acquise depuis tantôt sept ans qu'elles ont été introduites dans la brasserie. Jusqu'à présent, ce sont principalement les *brasseries* qui en ont tiré profit, mais le système de Hansen vient de faire aussi son entrée dans la distillerie et dans la fabrication de levure pressée, et en l'adoptant, ces branches de l'industrie de la fermentation s'assurent également des avantages importants. »

En Angleterre, plusieurs des autorités les plus célèbres ont ouvertement approuvé les travaux de Hansen. Sur le nombre se trouve M. le docteur Percy Frankland, qui s'exprime de la manière suivante (2) :

« Emile Christian Hansen, Copenhague, a extraordinairement augmenté nos connaissances sur les organismes

(1) Dingler's *Polytechnisches Journal*, 72e année, vol. 279, fascicule 9.

(2) *Royal Institution of Great Britain.* Assemblée du 19 février 1892.

producteurs d'alcool ou levures. Il a démontré qu'il existe plusieurs formes distinctes qui, bien qu'elles ne diffèrent que très peu au point de vue morphologique, possèdent néanmoins des propriétés caractéristiques bien déterminées, particulièrement sous le rapport de la nature de certaines petites quantités de produits secondaires, qu'elles font naître, et qui sont très importants, attendu qu'ils prêtent à la bière obtenue des caractères distinctifs. Hansen a indiqué comment ces différentes espèces de levures pouvaient être cultivées à l'état de pureté, même en des quantités suffisantes pour l'application industrielle, et il a, par cela, transformé de fond en comble la pratique brassicole sur le continent. Car, depuis les dernières années, ces levures pures, dont chacune possède des caractères spéciaux, se cultivent soigneusement dans des laboratoires installés *ad hoc*, d'où elles sont expédiées dans toutes les parties du monde, après que l'on a choisi les espèces de levures spéciales, propres à produire les différentes sortes de bière que l'on veut. De cette manière, on a réussi à introduire de l'exactitude scientifique et un succès certain dans une industrie où, précédemment, tant de choses dépendaient du hasard, et où presque tout reposait sur la routine et sur des travaux sans contrôle. »

Dans la *brasserie de fermentation haute*, le système est aujourd'hui adopté dans tous les pays. Bien qu'antérieurement déjà, différentes brasseries, en Amérique et en Australie, qui travaillent à la manière anglaise, avaient adopté la réforme, ce ne fut qu'en 1892 que W. R. Wilson parvint à introduire cette innovation dans une brasserie de Londres : il se servit d'une espèce de levure unique, choisie et cultivée, tant pour produire la fermentation principale que la fermentation secondaire. A la suite du compte rendu dans les publications anglaises, nombre de brasseries de la Grande-Bretagne ont adopté avec

succès l'emploi de levures cultivées par la méthode de Hansen.

Parmi tous les jugements prononcés, on pourrait citer en premier lieu le rapport suivant de Melbourne, en Australie, venant de M. J. C. Mac Cartie [1] :

« La levure pure [2] donne une bière moelleuse et pleine de bouche, ayant une grande limpidité, et de conservation facile, s'appropriant surtout à être mise en bouteilles. J'arrive ici à un fait qui intéressera le lecteur. M. de Bavay et moi nous lûmes avec quelque étonnement les rapports faits par quelques hommes de science anglais, sur la difficulté ou l'impossibilité d'obtenir une fermentation secondaire, en n'employant *qu'une race unique* de levure de *Saccharomyces cerevisiæ*. Or, nous n'avions pas rencontré la moindre difficulté à obtenir une fermentation secondaire dans les bières faites avec les levures d'Australie ou de « Burton ». J'ai examiné très souvent avec M. de Bavay du « stock » ainsi que des « bottled ales », dont la fermentation avait été produite par des cultures pures de la levure de Burton, et pour quiconque vit l'écume et le couvercle sur les bières, il n'y eut plus de doute qu'elles ne se trouvassent dans une fermentation secondaire énergique. M. de Bavay me communiqua que souvent il obtenait une fermentation secondaire bien prononcée dans l'espace de 15 jours, après la clarification (racking) de la bière, et ceci chaque fois que la levure utilisée arrivait fraîche du laboratoire et qu'elle était par conséquent, pour parler pratiquement, vierge du plus léger mélange d'autres races de levure » (La brasserie M. de Bavay, à Melbourne, est à fermentation haute).

(1) *The Brewers' Journal*, Londres 1889, n° 291, p. 489.

(2) Une race de « *Burton* » cultivée d'une levure anglaise dans le laboratoire de l'auteur du présent livre.

Se basant sur ces faits, M. Mac Cartie ne doute pas du tout, que dans peu d'années, le système de Hansen ne soit aussi adopté pour la *fermentation haute* dans toutes les brasseries importantes du monde. Son rapport détaillé offre un grand intérêt surtout par le fait qu'il nous donne une nouvelle preuve fournie par la pratique, de la différence des races du *Saccharomyces cerevisiæ*, et par conséquent en même temps une nouvelle invitation urgente, à faire un choix parmi ces races de celles qui répondent le mieux aux exigences pratiques.

M. W. R. Wilson écrit (1):

« Quelques brassins ont fermenté avec de la levure pure et ils ont été comparés à d'autres traités avec de la levure impure. Partout on reconnut que, autant qu'on pouvait en juger jusque là, l'ale fermentée avec de la levure pure était incontestablement supérieur à l'autre. Le système du culture pure de Hansen paraît applicable à la fabrication de l'ale, aussi bien qu'à celle du porter et du stout. »

Plus tard, le système a été appliqué entièrement dans cette et autres brasseries, et nombre de brasseries en Angleterre se sont servi de la levure d'une seule espèce avec d'excellents résultats.

M. le docteur E. Kokosinski, directeur du laboratoire de Lille, écrit: (2)

« C'est au mois d'août 1888, qu'après trois années d'études préalables, j'ai introduit, pour la première fois, la levure pure dans une brasserie de fermentation haute de Lille. Peu de temps après, au commencement de 1889, je l'ai fait entrer dans quelques autres brasseries de

(1) *The Brewers' Journal,* Londres 1892, p. 527.

(2) Application industrielle de la méthode Hansen à la fermentation haute dans le Nord de la France. *Compte rendu de la station scientifique de brasserie,* Gand, 1890.

Lille, Roubaix, Douai et St-Omer, et actuellement il y a, dans la région du Nord, une quinzaine de brasseries qui emploient la levure pure *et en obtiennent toutes, sans exception, d'excellents résultats industriels* ».

Il résume ses *expériences pratiques*, concernant les *bières fabriquées avec de la levure pure de fermentation haute,* dans les points suivants :

« 1° Elles ont le goût spécial recherché par le brasseur ;

2° Ce goût est régulier et toujours le même ; il se distingue par une grande franchise ;

3° La clarification en est plus facile et plus rapide ;

4° Enfin, elles sont plus résistantes à l'action des bactéries et se conservent mieux.

On voit, par ce qui précède, que si la méthode Hansen a rendu de grands services dans la fermentation basse, elle a commencé à en rendre et elle est appelée à en rendre de bien plus considérables encore dans la fermentation haute qui n'a pas, comme l'autre, le secours du froid pour la garantir contre l'action et le développement des ferments de maladie ».

M. le docteur van Laer, professeur à la Station Scientifique de Gand, s'exprime dans le même sens : (1)

« Joignant aux résultats pratiques auxquels je suis arrivé, ceux de MM. Joergensen et Kokosinski, on est en droit de dire que *la question de la levure pure est aussi bien résolue pour la fermentation haute que pour la fermentation basse*, et que sa propagation n'est plus qu'une question de temps ».

D'autres zymotechniciens célèbres tels que MM. Delbrück (Berlin), Flühler (Lyon), Griessmayer (Munich),

(1) Application industrielle de la méthode Hansen à la fermentation haute en Belgique, 1890. *Compte rendu de la Station scientifique de brasserie*, Gand, 1890.

Langer (Mödling), Maercker (Halle), Marx (Marseille), Schwackhöfer (Vienne), Thausing (Vienne) ; et d'autres encore, se sont exprimés, sur l'importance des innovations de Hansen, absolument de la même façon que les précédents. Plusieurs des anciens adversaires de ce savant se trouvent maintenant aux rangs de ses plus chauds partisans.

Pour terminer, on peut encore mentionner que les cultures pures des types nombreux et très variés de levure haute préparés depuis 1884, dans la section analytique du laboratoire de l'auteur du présent livre, ont donné en pratique identiquement les mêmes résultats favorables que les cultures de levure basse, pourvu qu'on les traite avec les soins nécessaires.

Dans ce qui précède, il n'a été question que de la brasserie. Mais les innovations de Hansen ont déjà commencé à s'introduire dans d'autres branches de l'industrie, où l'on a besoin de fermentations alcooliques. C'est ainsi que l'on a déjà fait des essais en maints endroits dans la *fabrication de la levure pressée* et dans la *distillerie*, et le système a déjà été introduit avec succès dans beaucoup d'usines. En 1888 déjà, un des élèves de Hansen, M. L. Marx (Marseille) a commencé, comme il a été indiqué plus haut, à l'appliquer à la *fermentation du vin* ; plus tard, d'autres savants ont travaillé en France dans le même but, ainsi que Messieurs Müller-Thurgau en Suisse, Forti et Pichi en Italie, Mach et Portele en Autriche, Wortmann en Allemagne. Pour la *fermentation du cidre*, de nombreuses expériences pratiques ont été faites par M. Kayser en France et par M. Nathan en Wurtemberg.

Une conséquence des célèbres découvertes de Hansen fut l'installation de *laboratoires spéciaux*, ayant pour but de préparer la levure absolument pure pour la pratique, d'exécuter les analyses nécessaires pour le con-

trôle de la fabrication, d'initier la jeune génération dans l'intelligence exacte de ces innovations et de lui en apprendre l'application rationnelle. Il existe aujourd'hui, dans presque tous les pays, des institutions de ce genre, tant subventionnés par les différents états, que privés, d'où sont déjà sortis nombre de professeurs, d'analystes et de praticiens, qui travaillent avec énergie et intelligence, afin de donner aux idées du savant danois une extension scientifique et pratique toujours plus grande.

Les travaux de Hansen ont agi par contre-coup sur *l'exploitation de la métairie*, où l'on emploie déjà, comme cela a été dit dans un chapitre précédent, avec succès des cultures pures de bactéries lactiques, pour l'acidification de la crème ; et enfin ils ont aussi eu leur écho dans la *fermentation du tabac*, où des essais ont été faits principalement par MM. Schlœsing et Suchsland, dans le but de donner aux feuilles de tabac un arôme déterminé en ajoutant pendant la fermentation des cultures pures de certaines espèces de bactéries.

L'idée qui est la base de tous ces travaux réformateurs, n'est autre, en définitive, que le principe établi depuis des siècles et des siècles, dans l'horticulture et dans l'agriculture, de semer uniquement l'espèce que l'on a en vue, pure et vierge de toute semence étrangère.

BIBLIOGRAPHIE

ADAMETZ, L. — Saccharomyces lactis, eine neue Milchzucker vergärende Hefeart. — Centralblatt f. Bakt. Bd. V. Nr. 4. 1889.

— Die Bacterien normaler und abnormaler Milch. — Oesterr. Monatsschrift für Tierheilkunde und Tierzucht. XV. Nr. 2. 1890.

— Untersuchungen über Bacillus lactis viscosus, einen weitverbreiteten milchwirtschaftlichen Schädling. — Berliner landwirtschaftl. Jahrbücher. 1891.

AHLBURG, Ueber Aspergillus oryzae. — Mitteil. der deutschen Gesellschaft für Natur-und Voelkerkunde Ost-Asiens, 16. Heft, 1876; et Dinglers polyt. Journal, 230. Bd., S. 330. 1878.

AMTHOR, C. — Studien über reine Hefen. — Zeitschrift für physiologische Chemie. Bd. XII. 1888.

— Ueber den Saccharomyces apiculatus. — Zeitschr. für physiologische Chemie. Bd. XII. 1888.

— Ueber Weinhefen. — Zeitschr. für angew. Chemie. 1889.

— Beobachtungen über den Saccharomyces apiculatus. — Chemiker-Zeitung. Nr. 38. 1891.

APPERT. — Le livre de tous les ménages ou l'art de conserver, pendant plusieurs années, toutes les substances animales et végétales. — 4e édit. (1e édit. 1810.) Paris, 1831.

ATKINSON. — The chemistry of saké-brewing in Japan, the processes of preparation of Koji and of fermentation. — Tokio, 1881.

AUBRY, L. — Ein Beitrag zur Klärung und Richtigstellung der Ansichten über reine Hefe. — Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. Nr. 7. Munich, 1885.

— Noch ein Wort über reine Hefe. — Ibid. Nr. 12, 1885.

— Ueber desinfizierende Stoffe. — Ber. d. Wiss. Stat. Munich, 1887. 1889.

— Beobachtungen über Hefe. — Mitt. der Wissenschaftl. Station für Brauerei, Munich. — Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. Nr. 4. 1892.

BAIL, TH. — Ueber Hefe. — Flora Nr. 27, 28. 1857.

BAINIER, G. — Observations sur les Mucorinées. — Ann. d. sc. nat. Bot. Sér. VI., T. XV. 1883.

BARY, DE. — Vergleichende Morphologie und Biologie der Pilze, Mycetozoen und Bakterien. — Leipsic, 1884.

— Vorlesungen über Bacterien. 2. Ausgabe. Leipsic. 1887.

BAU, A. — Ueber die scheinbare Zunahme des Dextringehaltes in Bierwürzen während der Gärung. — Wochenschr. f. Brauerei. Nr. 28, 1890.

— Ueber die scheinbare Zunahme des Dextringehaltes in Bierwürzen während der Gärung, sowie über die Bestimmung der Dextrose und des Dextrins in ihnen. — Wochenschr. f. Brauerei. Nr. 42, 1890.

— Die Bestimmung von Maltose, Dextrose und Dextrin in Bierwürze und Bier. mittels Reinkulturen von Gärungsorganismen. — Centralbl. f. Bakt. und Parasitenk. V. Jahrg. IX. Bd. 1891.

— Ueber die Zusammensetzung der Würzen in Bezugauf Kohlenhydrate. Woch. f. Brau. p. 1. 1891.

— Einige Bemerkungen über Hefereinzucht. Zeitschr. f. Spiritus industrie, p. 50. 1892.

— Ueber Obergärung und Reinzucht. Woch. f. Br. p. 1057. 1892.

— Zur quantitativen Bestimmung der Isomaltose. Woch. f. Br. p. 144. 1892.

— Beiträge zur Physiologie der Monilia candida. Woch. f. Brau. N° 43. 1892.

— Ueber die Bestimmung der vergärbaren Substanz in Bierwürzen Chem. Ztg. N° 80-82. 1892.

Bau, A. Ueber die Verwendung der Hefe zur quantitativen Bestimmung gärfähiger Substanzen. Chem. Ztg. N° 29. 1893.

— Ueber die Bestimmung der Isomaltose. Chem. Zeitung. N° 29. 1893.

— Ueber das Verhalten der Oberhefe gegenüber Isomaltose und Raffinose. Woch. f. Br. p 113. 1894.

Béchamp. — De l'influence de l'oxygène sur la fermentation alcoolique par la levure de bière. — Compt. rend. LXXXVIII. p. 430. 1879.

Bělohoubek, A. — Ueber die Erzeugung von Reisbier. — Bay Bierbr., 1870.

— Einige Worte über den Bau und die Einrichtung der Brauereien. — Prague, 1875.

— Studien über Presshefe. — Prague, 1876.

— Ueber die Erzeugung von Presshefe in Kartoffel-Brennereien. — Oesterreichische Brennereizeitung. 1878.

— Ueber die Obergärung von Bierwürzen. — Prague, 1881.

— Ueber den Einfluss der Hefe auf die Qualität des Bieres und über die Bedeutung der reinen Samenhefe für die Brauindustrie in Böhmen und Mähren. — Vortrag Böhm. Bierbrauer. Prague, 1885.

— Dr. Emile Chr. Hansen, eine biographische Skizze. — Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen, Munich, Nr. 24, 1889.

(De plus une série de traités sur la fermentation en langue tchèque).

Berthelot. — Sur la fermentation alcoolique. — Ann. de chim. et de phys. L. p. 322. 1857.

Beyerinck, M. W. — Die Laktase, ein neues Enzym. — Centr. f. Bakt. u. Parasit. VI. Bd. Nr. 2. 1889.

— Verfahren zum Nachweise der Säureabsonderung bei Mikrobien. — Centralbl. f. Bakt. und Parasitenkunde. IX. Bd. Nr. 24. 1891.

Biernacki, E. — Ueber die Eigenschaft der Antiseptica, die Alkoholgärung zu beschleunigen, und über gewisse Abhängigkeit ihrer Kraft von der chemischen Baustruktur, der Fermentmenge und der Vereinigung mit einander. — Pflügers Archiv. XLIX.

Billroth. — Untersuchungen über die Vegetationsformen von Coccobacteria septica. 1874.

Blankenhorn und Moritz. — Untersuchungen über den Einfluss der Temperatur auf die Gärung. — Ann. d. Oenologie 4. Bd. 1874.

Bordas. — Sur une maladie nouvelle du vin en Algérie.— Compt. rend. CVI. 1. 1888.

Borgmann, E. — Zur chemischen Charakteristik durch Reinkulturen erzeugter Biere. — Fresenius, Zeitschrift für analytische Chemie, B. XXV. Heft 4.

Bourquelot, E. — Sur les propriétés de l'invertine. — Journ. de pharm. et chim. VII. p. 131. 1883.

— Sur le non-dédoublement préalable du saccharose et du maltose dans leur fermentation lactique. — Journ. de pharm. et de chim. VIII. p. 420. 1883.

— Recherches sur les propriétés physiologiques du maltose. — Compt. rend. d. s. de l'Ac. d. sc. T. 97. Paris, 1883.

— Rech. sur les propriétés physiologiques du maltose. — Journ. de l'anat. et de la phys. 1886.

— Les microbes de la fermentation lactique du lait. Le Képhir. — Journ. de pharm. et de chim. XIII. 1886.

— Sur la fermentation alcoolique du galactose. — Journ. de pharm. et de chim. XVIII. p. 367. 1888.

— Sur la fermentation alcoolique du galactose. — Compt. rend. CVI. S. 283. 1888.

— Les fermentations. — Paris, 1889 et 1893.

Boutroux. — Sur la fermentation lactique. — Compt. rend. T. LXXXVI, 1874.

— Sur une fermentation nouvelle du glucose.— Compt. rend. T. LXXXXI, 1880.

— Sur l'habitat et la conservation des levures spontanées.— Bull. de la Soc. Linnéenne de Normandie. 3. sér. VII, 1883.

— Fermentation panaire. — Compt. rend. des. s. de l'Acad. des sc. T. CXIII. 1891.

Braeutigam, W. — Untersuchungen über die Mikroorganismen in Schlempe und Biertrebern. — Inaug.-Diss. Leipsic. 1886.

BREFELD. — Botan. Untersuchungen über Schimmelpilze. — I-4. Heft. Leipsic, 1872-1881.

— Mucor racemosus und Hefe. — Flora 56. Jahrg. 1873.

— Ueber Gärung I., II., III. — Landw. Jahrbücher III., IV., V., Bd. 1874, 1875, 1876.

— Methoden zur Untersuchung der Pilze. — Ber. d. mediz.-phys. Gesellsch. zu Würzburg. 1874.

— Beobachtungen über die Biologie der Hefe. — Sitzb. d. Gesellschaft naturforschender Freunde zu Berlin. Bot. Ztg. 1875.

— Botanische Untersuchungen über Hefenpilze (Fortsetzung der Schimmelpilze). — 5. Heft. Leipsic, 1883.

— Untersuchungen auf dem Gesamtgebiete der Mycologie. (Fortsetzung der Schimmel — und Hefenpilze). 6-10. Heft. Leipsic, 1884-1891.

BREJCHA. — Mikrosk. Analyse des Kühlgelägers. — Zeitschrift des Brauindustrie-Vereins f. d. K. Böhmen, 1879.

BROWN, A. J. — The chemical action of pure cultivations of Bacterium aceti. — Journ. Chem. Soc., p. 172, 1886. Chemical News LIII., p. 55. 1886.

— On an acetic ferment which forms cellulose. — Journ. Chem. Soc. p. 432, 1886.

— Further Notes on the Chemical Action of Bact. aceti. Ibid. p. 638, 1887.

— Note on the cellulose formed by Bact. xylinum. Ibidt p. 643, 1887.

— Some expériments on the numerical increase of yeas cells. — Transact. of the Laboratory Club. Vol. III., Nr. 4. Londres, 1890.

— On the influence of oxygen on fermentation. — Proceed. of the Chem. Soc. Nr. 107, p. 33. 1892.

BROWN, EORACE T., and MORRIS, G. H. — On the non-crystallisable products of the action of diastase upon starch. — Journ. of the Chemical Society, p. 527, 1885.

BUCHNER, ED. — Ueber den Einfluss des Sauerstoffes auf Gärungen. — Zeitschr. f. phys. Chemie IX. S. 380, 1885.

BUNGENER, H. — La levure de bière. — Moniteur scientifique du Dr. Quesneville. Paris, 1890.

BUNGENER, und WEIBEL, L. — Einiges über die Zusammensetzung des Würze-Extraktes — Allg. Brauer-und Hopfenzeitung, Nr. 5. 1891.

BÜSGEN. — Ueber Aspergillus Oryzae. — Botan. Centralblatt. Jahrg. VI., Nr. 41, S. 62. 1885.

CAGNIARD-LATOUR. — Journal de l'Institut. 1835-1837.

— Mémoire sur la fermentation vineuse. — Compt. rend. IV. S. 905, 1837.

CALMETTE. — Contribution à l'étude des ferments de l'amidon. — La levure chinoise. Ann. de l'Inst. Pasteur. T. VI., p. 607, 1892.

CHAPTAL. — L'art de faire le vin. 1807.

CHICANDART. — La fermentation panaire. — Monit. Scientif. Quesneville. Oct. 1883.

CIENKOWSKI. — Die Pilze der Kahmhaut. — Bull. d. Petersb. Akademie 1873.

— Zur Morphologie der Bakterien. — Mém. de l'Acad. de St-Pétersbourg. S. VII., T. XXV. 1887.

— Die Gallertbildungen des Zuckerrübensaftes. — Charkow, 1878.

CLUSS, A. — Die Reinzuchthefe und die Anwendung der Antiseptica, speciell der Fluorverbindungen, in der Brennerei Habilitationsschrift. Halle. a. S. 1893.

COHN, F. — Beiträge zur Biologie der Pflanzen. — 1. Bd. 2. H. 1872; 1 Bd. 3. H. 1875; 2. Bd. 2. H. 1876; 2. Bd. 3. H. 1877. (Recherches sur les bactéries).

— Ueber Kephir. — Sitzber. des Schles. Ges. für vaterländ. Kultur. Breslau, 1883.

— Ueber Schimmelpilze als Gärungserreger. — Jahrb. d. Schles. Gesellsch. f. vaterländ. Kultur zu Breslau. LXI., S. 226. 1884.

CONN, H. W. — Ueber einen bittere Milch erzeugenden Mikrokokkus. Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. IX. B. 1891.

DAVID. — Ueber Rotweingärungspilze. — Ann. d. Oenologie. 4. Bd. 1874.

DELBRUCK. — Die Säuerung des Hefengutes — Zeitschr. f. Spiritusindustrie, 1881.

DELBRÜCK. — Der Charakter des Bieres, auch des Weissbieres. — Woch. f. Brauerei. Nr. 6. Berlin, 1885.

— Die Carlsberger reingezüchtete Hefe. — Ibid. Nr. 10. 1885.

— Zur Wirkung der Kohlensäure-Entwickelung auf die Gärung. — Ibid. Nr. 42. 1886.

— Die Reinzuchthefe und die Presshefefabrikation. — Zeitschr. f. Spiritusindustrie. Berlin, 1889.

DONATH. — Ueber den invertierenden Bestandteil der Hefe. — Ber. d. deutsch. chem. Ges. VIII., p. 795. 1875.

DOWDESWELL. — On the occurrence of variations in the development of a Saccharomyces. Journ. Roy. Microsc. Soc. — Ser. II., vol. V. Londres, 1885.

DUCLAUX. — Mémoire sur le lait. — Ann. de l'Institut agronomique, 1882.

— Chimie biologique (Microbiologie). Paris, 1883.

— Fermentation alcoolique du sucre de lait. — Ann. d. l'Inst. Pasteur. Nr. 12. 1887.

DÜLL, G. — Zur Kenntniss des Bierextractes. Allg. Zeitschr. f. Bierbr. u. Malzfabr. N. 49. Vienne 1892.

DÜNNENBERGER, C. — Bakteriologisch-chemische Untersuchung über die beim Aufgehen des Brotteiges wirkenden Ursachen. — Botan. Centrablatt. Bd. 33. 1888.

DURST, O. — Handbuch der Presshefefabrikation. Berlin, 1888.

EHRENBERG. — Epistola de Mycetogenesi. — Nov. act. Acad. nat. cur. 1821.

EIDAM. — Der gegenwärtige Standpunkt der Mykologie. 1871-1872.

ELION, H. — Beiträge zur Kenntnis der Zusammensetzung von Würze und Bier. — Zeitschr. f. angew. Chemie. Heft II. 1890.

— Die Bestimmung von Maltose, Dextrose und Dextrin in Bierwürze und Bier mittelst Reinkulturen von Mikroorganismen. — Centralbl. f. Bakt. u. Parasitenk. IX. Bd. 1891.

ENGEL. — Les ferments alcooliques. — Thèse pour le Doct. ès. sc. nat. 1872.

FERMI, G. — Beitrag zum Studium der von den Mikroorganismen abgesonderten diastatischen und Inversionsfermente. Centralbl. f. Bact. u. Paras. Bd. XII. p. 713, 1892.

FERNBACH, A. — Sur le dosage de la sucrase. — Formation de la sucrase chez Aspergillus niger. — Ann. de l'Inst. Pasteur, p. 1, 1890.

— Sur l'invertine ou la sucrase de la levure. — Ann. de l'Inst. Pasteur. T. IV., p. 641. 1890.

FISCHER, B. — Ueber einen neuen bei Kahmhautpilzen beobachteten Fortpflanzungsmodus. Centralbl. f. Bact. u Paras. Bd. XIV. N° 20. 1893.

FITZ. — Ueber die alkoholische Gärung durch Mucor Mucedo und M. racemosus. — Ber. d. deutschen chem. Ges. VI., p. 48, 1873, et VIII., p. 1540, 1875.

— Ueber Schizomyceten-Gärungen. — Ber. d. deutschen chem. Gesellsch. Bd. 9 bis 17. 1876-1884.

FLÜGGE. — Die Mikroorganismen. — Leipsic, 1886.

FLÜHLER, A. — Conférence faite à la Société des sciences industr. de Lyon. — Section de chimie, 1886.

FOKKER, A. P. — Ueber das Milchsäureferment. — Fortschr. der Medicin. Nr. 11, 1889.

— Ueber das Milchsäureferment. — Centrabl. f. Bact. u. Parasitenk. VI. Bd., p. 472, 1889.

— Onderzoekingen omtrent melkzuurgisting. — Ned. Tijdschr. v. Geneesk., p. 88 and 509, 1890.

— Onderzoekingen over melkzuurgisting. — Weekblad van het Ned. Tijdschr. v. Geneesk. Nr. 4 et Nr. 19. 1890.

FORTI, C. — Contribuzione alla conoscenza dei lieviti di vino. — Le stazioni sperimentali agrarie Italiane. Vol. XXI., fasc. III, 1891.

— Relazioné intorno agli studi zimotecnici. Bolletino di Notizii agrari. Direzione générale del agricoltura. Rome (Nr. 12). 1893.

FOTH, G. — Einfluss der Kohlensäure auf Gärung und Hefebildung. — Wochenschr. f. Braurei, p. 73 et p. 305. Berlin, 1887.

FOTH, G. — Ueber den Einfluss der Kohlensäure auf das Wachsthum und die Gärthätigkeit der Hefe und ihre Bedeutung für die Konservirung des Bieres. — Woch. f. Br., p. 263, 1889.

FRAENKEL, C. — Grundriss der Bakterienkunde. — 3 Aufl. Berlin, 1890.

FRANKLAND, P. F. — New method for determining the number of microorganisms in air. — Proc. Roy. Soc. XLI., p. 443.

— Filtration of the air. — Philos. trans. of the Roy. Soc. Vol. 178, p. 113, 1887.

— and FOX, F. F. — On a pure fermentation of mannite and glycerine. Proc. Roy. Soc., Londres. Vol. XLVI, 1889.

— Micro-organisms in their relation to chemical change. — Roy. Inst. of Great Britain. Meeting Feb. 19, 1892.

— and MAC GRÉGOR. — Fermentation of Arabinose with the Bacillus ethaceticus. — Trans. Chem. Soc., 1892, p. 737.

— and Lumsden. — Decomposition of Mannite and Dextrose by the Bacillus ethaceticus. — Trans. Chem. Soc., 1892, p. 432.

— Bacteriology in its Relations to Chemical Science. Read at the British Association for the Advancement of Science. Sept. 1893.

— Sarcolactic Acid obtained by the Fermentation of inactive Lactic Acid. Transact. Chem. Soc., 1893.

FRESENIUS. — Beitraege zur Mycologie. 1850-63.

FREUND, P. — Die Reinzuchthefe und der Geschmack des Bieres. — Oesterr. Brauer — und Hopfen — Zeitung, 1890.

FRIEDLÄNDER. — Mikroskopische Technik. 5 Aufl. v. Eberth. Berlin, 1894.

GAYON. — Faits pour servir à l'histoire physiologique des moisissures. — Mém. de la Soc. des sciences phys. et naturelles de Bordeaux, 1878.

GAYON. — Sur la fermentation produite par le Mucor circinelloides — Ann. de Chim. et de phys. XIV., p. 258. 1878.

— Sur l'inversion et sur la fermentation du sucre de canne par les moisissures. — Bull. Soc. Chim. XXXI., p. 139, 1879.

— Sur un procédé nouveau d'extraction du sucre des mélasses. — Ann. agronomique. 1880.

GAYON et DUBOURG. — Recherches sur la réduction des nitrates par les infiniments petits. — Nancy, 1886.

— De la fermentation de la dextrine et de l'amidon par les Mucor. — Ann. de l'Inst. Pasteur. Nr. 11. 1887.

— et DUBOURG. — Sur la fermentation alcoolique du sucre interverti. — Compt. rend. de l'Académie. T. CX., p. 865. Paris, 1890.

— et DUPETIT. — Sur un moyen nouveau d'empêcher les fermentations secondaires. — Compt. rend. 8 Nov. 1886.

GIUNTI, M. — Sur l'effet de la lumière sur la fermentation acétique. — Le Stat. speriment. Agrar. Ital. XVIII.

GOETHE, R. — Bericht der Königl. Lehranstalt für Obst-und Weinbau zu Geisenheim a. Rh. Wiesbaden 1893. (Anwendung von reingezüchteten Hefen bei der Obstweingährung).

GOLDEN, K. E. — Fermentation of bread. — Botan. Gaz., p. 204. 1890.

GRAWITZ. — Beiträge zur systematischen Botanik der pflanzlichen Parasiten mit experimentellen Untersuchungen über die durch sie bedingten Krankheiten. — Virchows Archiv. B. 70. 1877.

GRIESSMAYER. — Hansen als Reformator der Gärungsindustrie. — Allg. Brauer-und Hopfenzeit. Nürnberg. 1890.

GROTENFELT, G. — Studien über die Zersetzung der Milch. — II. Ueber die Virulenz einiger Milchsäurebakterien. III. Ueber die Spaltung von Milchzucker durch Sprosspilze und über schwarzen Käse. — Fortschr. der Medicin. Nr. 4. 1889.

GRUBER, M. Eine Methode der Kultur anaërobischer Bakterien, nebst Bemerkungen zur Morphologie der Buttersäuregärung. — Centr. f. Bakt. u. Parasitenk, p. 367, 1887.

— Ueber die Methoden der Prüfung der Desinfectionsmittel. — Centr. f. Bakt. u. Parasitenk XI. B., p. 115. 1892.

GRÖNLUND. — Ueber Organismen in der Kühlschiffwürze. — Allg. Zeits. f. Bierbr. u. Malzfabr. Vienne, 1885.

— Ueber bitteren, unangenehmen Beigeschmack des Bieres. Z. f. d. ges. Brauwesen. München 1887.

— En ny Torula-Art og to nye Saccharomyces-Arter. Vidensk. Med. fra den Naturhist. Foren. Copenhague 1892.

GUILLEBEAU, A. — Beiträge zur Lehre von den Ursachen der fadenziehenden Milch. Landw. Jahrbücher der Schweiz. 1891.

HABERLANDT. — Das Vorkommen und die Entwickelung der sogenannten Milchsäurehefe. — Wissensch.-prakt. Untersuchungen auf dem Gebiete des Pflanzenbaues. 1875.

HAGEN-SCHOW. — Pure yeast and fermentation. — Trans. of the Lab. Club. p. 122, Vol. III. Londres 1890.

HANSEN, E. CHR. Les champignons stercoraires du Danemark. — Résumé d'un mémoire publié dans les " Vidensk.bl. Meddelelser " de la Société d'histoire naturelle de Copenhague 1876.

— Contributions à la connaissance des organismes qui peuvent se trouver dans la bière et le moût de bière et y vivre. — Compt. rend. des : Meddel. fra Carlsberg Laboratoriet. Copenhague. 1. Bd., 2. H. 1879. (Tous les comptes rendus du Laboratoire Carlsberg, se vendent chez M. H. Hagerup, libraire, à Copenhague).

— Oidium lactis. — Compt. rend. des Medd. fra Carlsb. Lab. 1. B., 2. H. 1879.

— Saccharomyces colorés en rouge et cellules rouges res-

semblant à des Saccharomyces. — Compt. rend. des Medd. fra Carlsb. Lab. I. B. 2. H. 1879.

— Sur l'influence que l'introduction de l'air atmosphérique dans le moût qui fermente exerce sur la fermentation. — Compt. rend. des Medd. fra Carlsb. Lab. I. B., 2. H. 1879.

— Hypothèse de Horvath. — Compt. rend. des Medd. fra Carlsb. Lab. I. B., 2. H. 1879.

— Mycorderma aceti (Kütz.) Pasteur et Myc. Pasteurianum nov. sp. — Compt. rend. des Medd. fra Carlsb. Lab. I. B., 2. H. 1879.

— Chambre humide pour la culture des organismes microscopiques. — Compt. rend. des Meddel, fra Carlsberg Laboratoriet. I. Bd., 3. H. 1881.

— Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques. I. Sur le Sacch. apiculatus et sa circulation dans la nature. — Compt. rend. des Meddel. fra Carlsberg Laboratoriet. I. Bd., 3. H. 1881.

— Recherches sur les organismes qui, à différentes époques de l'année, se trouvent dans l'air, à Carlsberg et aux alentours, et qui peuvent se développer dans le moût de bière (II). — Compt. rend. des Meddel. fra Carlsb. Laborat. I. Bd., 4. H. 1882.

— Recherches sur la physiol. et la morphol. des ferments alcooliques. II. Les ascospores chez le genre Saccharomyces. III. Sur les Torulas de M. Pasteur. IV. Maladies provoquées dans la bière par des ferments alcooliques. — Compt. rend. des Meddel. fra Carlsb. Lab. II. Bd., 2. H. 1883.

— Bemerkungen über Hefenpilze. — Allgem. Zeitschr. für Bierbrauerei und Malzfabrikation. Vienne, 1883.

— Neue Untersuchungen über Alkoholgärungspilze (Monilia). — Berichte d. deutschen botan. Gesellsch. 1884.

— Uber Wiesners neue Prüfungsmethode der Presshefe. — Dinglers Polytechn. Journal. S. 419. 1884.

HANSEN. — Einige kritische Bemerkungen über Dr. Hueppes Buch : "Die Methoden der Bakterienforschung." — Zeitschr. f. wissensch. Mikrosk. und mikroskopische Technik. Bd. II. 1885.

— Vorläufige Mitteilungen über Gärungspilze. (Gelatin. Netzwerk. — Scheidewandbildung. — Sacch. apiculatus.) — Botan. Centralblatt. Bd. XXI., Nr. 6 1885.

— Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques. V. Méthodes pour obtenir des cultures pures de Saccharomyces et de microorganismes analogues. VI. Les voiles chez le genre Saccharomyces. — Compt. rend. des Meddel. fra Carlsb. Laboratoriet II. Bd., 4. H. 1886.

— Ueber Hefe und Hefereinzucht. Vortrag in der Generalversamml. der Oesterr. Brauerbundes am 12 juni 1887 in Graz. Zeitschr. f. Biebr. in Malzfabr. 1887. Compt. rend. dans le Centralblatt. f. Bakteriologie, p. 118, 1887.

— Über rot und schwarz gefärbte Sprosspilze. — Allg. Brauer-und Hopfenzeitung. Nr. 95. Nuremberg. 1887.

— Noch ein Wort über den Einfluss der Kohlensäure auf Gärung und Hefebildung. — Zeitschr. f. d. ges. Brauw. Nr. 13. S. 304. Munich, 1887.

— Neue Bemerkungen zu Foths Abhandlung: " Einfluss der Kohlensäure auf Gärung und Hefebildung. " — Wochenschr. f. Brauerei. S. 378. Berlin. 1887.

— Methode zur Analyse des Brauwassers in Rücksicht auf Mikroorganismen. — Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen Nr. 1. Munich, 1888.

— Ueber die zymotechnische Analyse der Mikroorganismen der Luft. — Prager Brauer- und Hopfenzeitung. Nr. 19. Prague, 1888.

— Untersuchungen aus der Praxis der Gärungsindustrie. — I. Heft. Munich (Oldenbourgs Verlag) 1888. Zweite Ausg., 1890. (II Heft. 1892.)

— Recherches sur la physiologie et la morphologie des

ferments alcooliques. VII. Action des ferments alcooliques sur les diverses espèces de sucre. — Compt. rend. des Meddel. fra Carlsb. Laborat. II. Bd., 5. H. 1888.

— Recherches faites dans la pratique de l'industrie de la fermentation. Contributions à la biologie des microorganismes. I. Introduction. II. Culture pure de la levure au service de l'industrie. III. Observations faites sur les levures de bière. IV. Sur l'examen pratique, au point de vue de la conservation, de la bière contenue dans les tonneaux des caves de garde. — Compt. rend. des Meddel. fra Carlsb. Labor. II. Bd., 5. H. 1888.

— Uber die im Schleimflusse lebender Bäume beobachteten Mikroorganismen. — Centralbl. f. Bakteriologie u. Parasitenk. V. Bd., p. 632. 1889.

— Some points in connection with practical brewing : I. On the bacteriological analysis of the water and the air for brewing puposes. II. On my system of pure yeast culture and its application in breweries with top fermentation. — Transact. of the Laboratory Club. Londres 1889.

— Production des variétés chez les Saccharomyces. — Ann. de micrographie. P. Miquel. T. II., Nr. 5., p. 214. Paris 1890.

— Ueber die Pilzstudien in der Zymotechnik, Mit besonderer Rücksicht auf Prof. Dr. Zopfs neues Werk : "Die Pilze in morphologischer, physiologischer, biologischer und systematischer Beziehung." — (Breslau, 1890.) Zeitzschr. f. d. ges. Brauw. N° 16. Munich, 1890.

— Nouvelles recherches sur la circulation du Saccharomyces apiculatus dans la nature. — Ann. d. sc. nat. Botanique. VII. série. T. XI., Nr. 3, p. 185. 1890. Ann. de Micrógr. Paris, 1890.

— Qu'est-ce que la levure pure de M. Pasteur ? Une recherche expérimentale. — Compt. rend. d. Meddel. fra Carlsb. Lab. III. B., I. H. 1891.

HANSEN — Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques. VIII. Sur la germination des spores chez les Saccharomyces. — Compt. rend. d. Meddel. f. Carlsb. Lab. III. B., I. H., 1891.

— Neue Untersuchungen über den Einfluss, welchen eine Behandlung mit Weinsäure auf die Brauereihefe ausübt. — Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. Nr. I. Munich. 1892.

— Kritische Untersuchungen über einige von Ludwig und Brefeld beschriebene Oïdium-und Hefeformen. — Botan. Zeit. Nr. 19. 1892.

— Recherches faites dans la pratique de l'industrie de la fermentation. (Contribution à la biologie des microorganismes). V. Sur l'analyse zymotechnique des microorganismes de l'air et de l'eau. VI. Nouvelles recherches sur les maladies provoquées dans la bière par des ferments alcooliques (Deuxième mémoire). VII. Sur l'extension actuelle de mon système de culture pure de la levure. — Compt. rend. d. Medd. fra Carlsb. Lab. III. B., 2. H. 1892.

— Untersuchungen aus der Praxis der Gärungsindustrie. (Beiträge zur Lebensgeschichte der Mikroorganismen). — II. Heft. Munich. Oldenbourgs Verl. 1892.

— Ueber die neuen Versuche, das Genus Saccharomyces zuzstreichen. — Centralbl. f. Bakt. u. Paras. XIII. B. Nr. 1. 1893.

— Botanische Untersuchungen über Essigsäurebakterien. Berichte der deutschen botan. Gesellschaft. 1893.

— Recherches sur les bactéries acétifiantes (Second mémoire). Compt. rend. des Meddel. fra Carlsberg Laborat. III. B. 3. H. 1894

HARZ. — Unters. über die Alkohol-und Milchsäuregärung. — Z. d. Allg. Oesterr. Apotheker-Vereins. 1870-71.

— Grundzüge der alkoholischen Gärung. — Munich, 1877.

HAYDUCK. — Ueber die Existenz von Hefenrassen mit konstant sich erhaltenden Eigenschaften. — Wochenschr. f. Brauerei, Nr, 20. Berlin, 1885.

HAYDUCK. — Ueber Milchsäuregärung. — Wochenschr. f. Br., Nr. 17. Berlin, 1887.

HEDIN, S. G. — Om bestämning af drufsocker genom förjäsning och uppmätning af kolsyrans volym. — Lunds Univers. Årskrift T. XXVII. 1891.

HEINZELMANN, G. — Die Reinzuchthefe in der Brennerei. — Zeitschr. für Spiritusindustrie. XV. Jahrg. Nr. 25. 1892.

HESSE. — Ueber quantitative Bestimmung der in der Luft enthaltenen Mikroorganismen. — Mitteil. d. K. Gesundheitsamtes. Bd. II. 1884.

HIEPE, W. L. — On some Products of Starch Transformation. The Country Brewers Gazette. Londres 1893-94.

HIRSCHFELD, E. — Ueber die Einwirkung des künstl. Magensaftes auf Essigsäure-und Milchsäuregähung. Pflüges's Arch. f. d. ges. Physiologie. XLVII. p. 510. 1890.

HITSCHCOCK. — Studies of atmospheric dust. — Americ. monthly microscop. Jonrnal, I. 1880.

HOLM, J. CHR. — Aeltere und neuere Ansichten über Oberhefe und Unterhefe. — Deutscher Brauer-und Mälzer-Kalender. 1886-87.

— Die Vorrichtungen in der Brauerei zur Kühlung und Lüftung der Würze. — Zeitschr. f. d. ges. Brauw. Nr. 20. 1887.

— Bemerkung zu Foths Abhandlung über den Einfluss der Kohlensäure auf die Gärthätigkeit der Hefe. — Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. p. 301. Nr. 15. Munich. 1889.

— Sur les méthodes de culture pure et spécialement sur la culture de plaques de Koch et la limite des erreurs de cette méthode. — Compt. rend. des Meddelels. fra Carlsb. Laborat. Bd. III., E. 1. 1891

— Ueber die Methoden der Reinkultur und im besonderen über die Plattenkultur von Koch und über die Fehlergrenze dieser Methode, — Zeitschr. f. d. ges. Brauw. p. 458. Munich, 1891.

— Analyses biologiques et zymotechniques de l'eau desti-

née aux brasseries. — Compt. rend. des. Meddelel· fra Carlsb. Laborat. III. Bd., 2. H. 1892.

Holm et Joergensen. — Le procédé de M. Effront, etc. (voir Joergensen).

Holm et Poulsen. — Jusqu'à quelle limite peut-on, par la méthode de M. Hansen, constater une infection de " levure sauvage " dans une masse de levure basse de Saccharomyces cerevisiæ ? — Compt. rend. des Meddelels. fra Carlsb. Laborat. II. Bd., 4. H. 1886.

— Jusqu'à quelle limite, etc. Deuxième Communicat. — Compt. rend. des Meddelels. fra Carlsb. Laborat. II. Bd., 5. H. 1888.

Holst, A. — Oversigt over Bakteriologien for læger og studerende. — Christiania, 1890.

Holzner. — Ueber Trübung des Bieres. — Der Bayerische Bierbrauer. p. 14. 1871.

— Zymotechnische Rückblicke auf das Jahr 1877. — Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. p. 142. 1878.

Horvath. — Ueber den Einfluss der Ruhe und der Bewegung auf das Leben. — Pflügers Archiv. für die gesamte Physiologie, Bd. 17. 1878.

Hueppe., F. — Untersuchungen über die Zersetzungen der Milch durch Mikroorganismen. Zur Geschichte der Milchsäuregärung. — Mitt. a. d. K. Gesundheitsamte. Bd. II. 1884.

— Die Methoden der Bakterienforschung. 1891.

Hulle, L. v. d. und Laer, H. v. — Nouvelles recherches sur les bières Bruxelloises à fermentation dite spontanée. — Mém. cour. et autres mém. publiés par l'Ac. Royale de Belgique. Bruxelles, 1891.

Ikuta, M. — Die Saké-Brauerei in Japan. — Chemikerzeit. Nr. 27. 1890.

Irmisch, M. — Der Vergärungsgrad, zugleich Studien über zwei Hefecharaktere. — Wochenschr. f. Brauerei. Nr. 39—46. Berlin. 1891.

Jacobsen, J. C. — Ueber die Carlsberger reingezüchtete Hefe. — Wochenschr. fur Brauerei Nr. 10. Berlin, 1885.

JANSSENS, F. A. — Beiträge zu der Frage über den Kern der Hefezelle. — Centralbl. f. Bakt. ü. Paras. XIII. B., Nr. 20. 1893.

JAQUEMIN, G. — Du Saccharomyces ellipsoideus et de ses applications industrielles à la fabrication d'un vin d'orge. — Compt. rend. T. CVI. Nr. 10. 1888.

JENSEN, C. O. — Bakteriologiske Undersögelser over vises Maelke-og Smörfejl. — 22. Beretn fra den Kgl. Landbohöjsk. Laborat. Copenhague, 1891.

JODLBAUER, M. — Ueber die Anwendbarkeit der alkoholischen Gärung zur Zuckerbestimmung. — Z. f. Rübenzuckerindustrie. Nr. 15. 1888.

JOERGENSEN, Alfred. — Zur Analyse der Presshefe. — Dinglers polytechn. Journal. Bd. 252, S. 424. 1884.

— Ueber das Verhältnis der Alkohol-Fermentorganismen gegenüber der Saccharose. — Allg. Br. u. Hopfzfg. Nr. 20. Nuremberg. 1885.

— Giebt es verschiedene Rassen der sogenannten Saccharomyces cerevisiæ ? — Ibid., 1885, Festnummer.

— Vorläufiger Bericht über Versuche im grossen mit absolut reiner Oberhefe, nach Hansens Methode dargestellt. — Allg. Zeitschr. für Bierbr. und Malzfabr. Nr. 36. Vienne 1885.

— Reingezüchtete Oberhefe. — Allgem. Brauer-und Hopfenztg. N. 8. Nuremberg, 1886.

— Ueber den Unterschied zwischen Pasteurs und Hansens Standpunkt in der Hefenfrage. — Zeitschr. f. d. ges. Brauw. Munich, 1888.

— Neue Bemerkungen über die Kulturmethoden und die Analyse der Hefen. — Zeitschr. f. d. ges. Brauw. Munich, 1888.

— Brefelds neue Hefenuntersuchungen. — Allg. Brauer- und Hopfenztg. Nr. 74. Nuremberg, 1888.

— Die zymotechnische Wasser-Analyse in Hueppes Buch : Die Methoden der Bakterienforschung. — 4. Aufl.

1889. — Centralblatt. für Bakteriologie. V. Bd., Nr. 22. 1889.

— Die Anwendung der nach Hansens Methode reingezüchteten obergärigen Hefe in der Praxis. — Brauer- und Mälzer-Kalender für Deutschland und Oesterreich. 1889-90.

— Critique de: Duclaux, Sur la conservation des levures. — Botanisches Centralblatt. X. Jahrg., Nr. 49, 1889.

— Die Aufbewahrung der ausgewälten Hefenrasse. — Allg. Zeitschr. f. Bierbr. und Malzf., Nr. 46. Vienne, 1890.

— Sarcina. — Allg. Br. und Hopfenztg. Nr. 115. Nuremberg, 1890.

— Zur Analyse der obergärigen Hefe in Brauereien und Brennereien nach Hansens Methode. — Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. Nr. 3. Munich, 1891.

— Ueber die Analyse der Brauereihefe nach Hansens Methode. — Der amerik. Bierbr. Chicago, 1891.

— Les méthodes de Pasteur et de Hansen pour obtenir des cultures pures de levure. — Une réponse à M. Velten. — La Gazette du brasseur. Nr. 215. Bruxelles, 1891.

— Die Feinde des Brauereibetriebes. Vortrag, gehalten bei der schwedischen Brauerversammlung in Gothembourg. — Allgem. Brauer-und Hopfenzeitung. Nr. 97-98. Nuremberg, 1891.

— Die Mikroorganismen der Gärungsindustrie. 3e édition. Berlin, 1892.

— et Holm, Just Chr. — Le procédé de M. Effront pour la purification et la conservation de la levure à l'aide de l'acide fluorhydrique et des fluorures. — Moniteur scientif. du Dr. Quesneville. 4 ser., T. VII. Mars. Paris, 1893. (Chemiker Zeitung, Nr. 23. 1893.)

— On the Application of Hansen's. System in Breweries with Top-fermentation. Written for the International Brewers' Congress in Chicago, 1893. (American Brew. Review, Chicago, N° 50 et suiv. 1893) Comptes-rendus du Congrès: Proceedings of the Intern. Brew. Cong., New-York, 1893.

JOERGENSEN, Alfred. — Micro-organisms and Fermentation. New. édition. Londres, 1893.

— On Hansen's System of Pure Yeast Culture in English top-fermentations; with some experimental enquiries and remarks on Dr. van Laers Hypothesis of composite yeast. Trans. Inst. of brewing. Vol. VII. Londres, 1894.

KABRHEL, G. — Ueber das Ferment der Milchsäuregärung in der Milch. — Allgem. Wien. med. Ztg. Nr. 52 u. 53. 1889.

KAYSER, E. — Action de la chaleur sur les levures. — Ann. de l'Inst. Pasteur. Nr. 10. 1889.

— Études sur la fermentation du cidre. — Ann. de l'Inst. Pasteur, Nr. 6, 1890.

— Note sur les ferments de l'ananas. — Ann. de l'Inst. Pasteur, 1891.

— Contribution à l'étude physiologique des levures alcooliques du lactose. — Ann. de l'Institut Pasteur. Nr. 6 1891.

— Contribution à l'étude des levures de vin. Ann. de l'Inst. Pasteur. T. VI. 1892.

KELLNER, MORI und NAGAOKA. — Beiträge zur Kenntnis der invertierenden Fermente. — Zeitschr. für physiolog. Chemie. XIV. Bd., 3. H. 1889.

KERN. — Ueber ein Milchferment des Kaukasus. — Botanische Zeitg. 1882. Biolog. Centralblatt., 1882.

KLEBS, J. — Ueber fraktionierte Kultur. — Archiv. f. experiment. Pathologie. Bd. I.

KLEIN, C. — Beitrag zur Kenntniss des roten Malzschimmels. — Mitt. a. d. Oesterr. Versuchsstation f. Brauerei u. Mälzerei. V. Heft. Vienne, 1892.

KLEIN, E. — Micro-organisms and disease. — Londres, 1884.

KLEIN, L. — Botan. Bakterienstudien I. — Centrabl. f. Bact. u. Paras. Bd. VI, Nr. 12-14. 1889.

— Botan. Bakterienstudien II. — Berichte der deutschen botan. Gesellschaft. Bd. VII. Berlin, 1889.

KNIERIM, W. v. und AD. MAYER. — Ueber die Ursache der

Essiggärung. — Die landw. Versuchsstat. Bd. XVI. 1873.

Koch, Alfred. — Jahresbericht über die Fortschritte in der Lehre von den Gärungsorganismen. I. (1890). 1891. II. (1891). 1892. III. (1892) 1893.

Koch, R. — Verfahren zur Untersuchung, zum Konservieren und Photographieren der Bakterien. — Beitr. z. Biol. II.

— Ueber Desinfektion. Mitt. d. K. Gesundheitsamtes. 1881.

— Zur Untersuchung von pathogenen Organismen. — Mitt. d. K. Gesundheitsamtes. Bd. I. Berlin, 1881.

Koehler, J. — Saccharomyces membranaefaciens Hansen. — Mitt. a. d. Oesterr. Versuchsstation f. Braueri u. Mälzerei. V. Heft. Vienne, 1892.

Kokosinsky, Ed. — Levure pure de fermentation haute. — Gaz. du brasseur. Nr. 115. 1889.

— A propos de levure pure. — La brasserie du Nord (de la France). Nr. 169, 1889.

— La levure pure. Gaz. du brass. Nr. 142. 1890.

— Application industrielle de la méthode Hansen à la fermentation haute dans le Nord de la France. — Compt. rend. de la Station scientifique de brasserie. Gand. T. I. 1890.

Kramer, Ernst. — Studien über die schleimige Gärung. — Sitzb. d. K. Akad. d. Wiss. Vienne. Monatshefte für Chemie. X. 1889.

— Einwirkung von Saccharomyces Mycoderma auf Wein. — Agramer botan. phys. Inst. 1889.

— Bakteriologische Untersuchungen über das " Umschlagen " des Weines. — Landwirtschaftl. Versuchsstationen. Bd. XXXVII.

— Ueber einen rotgefärbten, bei der Vergärung des Mostes mitwirkenden Sprosspilz. — Oesterr. landw. Centralblatt. I. 1891.

Krasser. — Ueber das angebliche Vorkommen eines Zellkerns in den Hefenzellen. — Oesterr. botan. Zeitschr. Nr. 11. 1885.

KRATSCHMER und NIEMILOWICZ. — Ueber eine eigentümliche Brotkrankheit. — Wiener klin. Woch. Nr. 30. 1889.

KUKLA. — Die heurigen trüben Biere. — Bericht der Versuchsanstalt für Brauindustrie in Böhmen. Prager Brauer- und Hopfenztg. Prague, 1889.

KUTZING. — Mikroskopische Untersuchungen ueber die Hefe und Essigmutter. — Journal für prakt. Chemie II. p. 385. 1837.

— Phycologia generalis. — S. 148. 1843.

— Grundzüge der philosophischen Botanik. 1851.

LAER, H. VAN. — Note sur les fermentations visqueuses. — (Mémoires couronnés et autres mémoires publ. par l'Académie royale de Belgique. T. XLIII., 1889).

— Application industrielle de la méthode Hansen à la fermentation haute. — Station scientifique de brasserie. Compt. rend. T. 1. Gand, 1890.

— Contribution à l'histoire des ferments des hydrates de carbone. Bacille des bières tournées. — Mém. publ. par l'Acad. royale de Belg. 1892.

— Studies on secondary fermentations and frets. Trans. Inst. of brewing. Vol. VII. Londres, 1894.

— et V. D. HULLE. — Nouvelles recherches sur les bières Bruxelloises à fermentation dite spontanée. — Mém. cour. et autres mém. publiés par l'Académie royale de Belgique. Bruxelles, 1891.

LAFAR, FRZ. — Physiologische Studien über Essiggärung und Schnellessigfabrikation. I. — Centralbl. f. Bakt. ü. Paras. XIII. Nr. 21-22. 1893.

LANGER, TH. — Grundriss der Chemie für Brauer und Mälzer. — Leipsic, 1890.

LASCHÉ, A. — Die amerikanische Brauereihefe. — Der Braumeister. Nr. 6. Chicago, 1891.

— Mycoderma-Arten. — Der Braumeister. Nr. 7. Chicago, 1891.

— Das Mycoderma und die Praxis. — Der Braumeister. Nr. 10. Chicago, 1891.

— Saccharomyces Joergensenii. — Der Braumeister. Nr. 8. Chicago, 1892.

— Two species of red Mycoderma. — Der Braumeister. Nr. 9. Chicago, 1892.

— The action of certain species of pure yeast in practice. — Der Braumeister. Nr. 9, p. 282. Chicago, 1892.

— Influence of certain temperatures upon different yeast forms, contained in acid and alkaline nutrient media. — Der Braumeister. Nr. 15 and 17. Chicago, 1892.

— Die Bestimmung der Zuckerarten dursh Vergaerung. Vortrag vor dem Intern. Brauer-Congress in Chicago, 11-14. Sept. 1893. American. d. Brewers' Review. Chicago. Nr. 18. 1893.

LAURENT, C. — Le Bactérie de la fermentation panaire. — Bull. de l'Académie roy. de Belgique. T. X., Nr. 12. 1885.

LECHARTIER et BELLAMY. — Étude sur les gaz produits par les fruits. Note sur la fermentation des fruits. — Compt. rend. LXIX., 1869; LXXV., 1872 ; LXXIX., 1874.

LIBORIUS, P. — Beiträge zur Kenntniss des Sauerstoff-bedürfnisses der Bakterien. — Z. f. Hygiene. 1. Bd., I. H. Berlin, 1886.

LINDET, L. — Influence de la température de fermentation sur la production des alcools supérieurs. — Compt. Rend. de l'Ac. des sc. de Paris, T. CVII., Nr. 3. 1888.

LINDNER, P. — Ueber ein neues, in Malzmaischen vorkommendes, Milchsäure bildendes Ferment. — Wochenschr. f. Br. Nr. 23. 1887.

— Die Askosporen und ihre Beziehungen zur Konstanz der Hefenrassen. — Wochenschr. f. Br. Nr. 39. 1887.

— Ueber rot und schwarz gefärbte Sprosspilze. — Wochenschr. f. Br. Nr. 44. Berlin, 1887.

— Nachweis von Mikroorganismen in der Luft von Gärungsbetrieben. — Wochenschr. f. Br. 1887.

— Verändert sich der Charakter einer Brauereihefe bei fortgesetzter Kultur unter veränderten Ernährungsbedingungen? — Wochenschr. f. Br. Nr. 3. 1888.

— Ueber einige Gärversuche mit verschiedenen Hefen. — Wochenschr. f. Br. Nr. 14. 1888.

— Das Langwerden der Würze durch Dematium pullulans. — Wochenschrift f. Br. Nr. 15. 1888.

LINDNER, P. — Die Sarcina-Organismen der Gärungsgewerbe. Berlin, 1888.

— Die Ursache des langen Weissbieres. — Wochenschr. f. Br. Nr. 9. 1889.

— Ruft Sarcina im untergärigen Biere Krankheitserscheinungen hervor oder nicht ? — Wochenschr. f. Br., p. 161. 1890.

— Bemerkungen zu Joergensens Aufsatz über Sarcina. — Wochenschr. f. Br. Nr. 41. 1890.

— Schizosaccharomyces Pombe n. sp., ein neuer Gährungserreger. Woch. f. Brau. Nr. 49. 1893.

LINOSSIER, G., et ROUX, G. — Sur la fermentation alcoolique et la transformation de l'alcool en aldéhyde provoquées par le champignon du muguet. — Compt. rend. de l'Acad. des sc. de Paris. T. CX. 1890.

LINOSSIER, G. — Action de l'acide sulfureux sur quelques champignons inférieurs et en particulier sur les levures alcooliques. — Ann. d. l'Institut Past. T. V. 1891.

LINTNER, C. — Ueber Bierträbung. — Der Bayrische Bierbrauer, p. 64. 1871.

— Ueber einige Resultate zymotechnischer Untersuchungen. — Zeitschr. für das ges. Brauwesen p. 221. 1876.

— Lehrbuch der Bierbrauerei. 1878.

— Ueber Malz und dessen Einfluss auf die Haltbarkeit und Güte des Bieres. — Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen, p. 384. 1880.

— Altes und Neues über Bierbrauerei. — Zeitschr. für das ges. Brauw. p. 153. 1881.

— Zymotechnische Rückblicke auf das Jahr 1884. — Zeitschr. f. d. ges. Brauw. S. 399. Munich. 1885.

LINTNER, C. J. — Ueber Isomaltose und deren Bedeutung für die Bierbrauerei. — Zeitschr. f. d. ges. Brauw. P. 6. 1892.

LINTNER. — Ueber die Vergärbarkeit der Isomaltose. — Ibid., P. 106. 1892.

— Handbuch der landwirtschaftlichen Gewerbe. Berlin, 1893.

— Grundriss der Bierbrauerei. — Berlin. 1893.

— Ueber den Abbau der Stärke unter dem Einflusse der Diastasewirkung. Ber. d. deutsch. chem. Gesels. XXVI. 2533. Zeitschr. f. d. g. Brauw. XVI. N. 51. 52. 1893.

LISTER. — On the nature of fermentation. — Quarterly Journal of microscopical science. Vol. 18. 1878.

— On the lactic fermentation and its bearing on pathology. — Transact. of the Pathological Society of London. Vol. 29. 1878.

LOEFFLER. — Vorlesungen über die geschichtliche Entwickelung der Lehre von den Bakterien. 1887.

LOEW, E. — Ueber Dematium pullulans. — Pringsh. Jahrb. Bd. VI.

LOEW, O. — Die chemischen Verhältnisse des Bakterienlebens. — Centralbl. f. Bakt. und Parasitenkunde. IX. Bd. 1891.

LUDWIG, F. — Weitere Mitteilungen über Alkoholgärung und die Schleimflüsse lebender Bäume. — Centr. f. Bakt. und Paras. VI. Bd. Nr. 5-6. 1889.

MAC-CARTIE, J.-C., und DE BAVAY. — On the application of Hansen's system in top-fermentation breweries. — Austral. Br. Journal, 20 Dec., 1886. and 20 Jan., 1889. The Brewers' Journal (Londres), Nr. 291. 1889.

MACH, E., und PORTELE, K. — I. Ueber die Gärung von Trauben-und Aepfelmost mit verschiedenen reingezüchteten Hefenarten 2. Ueber das Verhältniss, in welchem sich Alkohol und Hefe während der Gährung bilden. 3. Ueber den Gehalt an stickstoffhaltigen Substanzen in Traubenmosten aus dem Anstaltsgute in S. Michele. 4. Uber die Veränderungen im Gehalt von Gesamtsäure und Glycerin während der Gärung und Lagerung der Weine. 5. Versuch über

die Abnahme des Farbstoffgehaltes beim Lagern der Weine. 6. Ueber die Zusammensetzung einer Anzahl Aepfel-und Birnsorten aus dem Anstaltsgute. — Die Landwirtsch. Versuchsstationen, herausg. v. Nobbe. B. XLI. Heft. 4. Berlin, 1892.

MARCANO. — Fermentation de la fécule, présence d'un vibrion dans les grains du maïs qui germe. — Compt. rend. p. 345. 1882.

MAERCKER, M. — Handbuch der Spiritusfabrikation. — 6. Auflage. Berlin, 1894.

MAERCKER, CLUSS und SCHUPPAN. — Das Flussäureverfahren in der Spiritusfabrikation. Berlin, 1891.

MARSHALL WARD, H. — The ginger beer plant, and the organisms composing it. Philos. Trans. Roy. Soc., Vol. 183 B. p. 125. 1892.

MARTINAND. — Étude sur l'analyse des levures de brasserie. — Compt. rend. de l'Ac. d. sc. de Paris, T. CVII., Nr. 19. 1888.

— et RIETSCH. — Des microorganismes que l'on rencontre sur les raisins mûrs et leur développement pendant la fermentation. Compt. rend. de l'Ac. d. sc. Paris. T. CXII.

MARX. — L. — La levure pure de brasserie. — Revue universelle de la brasserie et la malterie. Nr. 622. 1885.

— Le laboratoire du brasseur. — 2e éd. Paris, 1889.

— Les levures des vins. — Moniteur scientifique du Dr. Quesneville. Paris, 1888.

MATTHEWS. — On the red mould of Barley. Journal of the Roy. Micr. Soc. Londres, 1883.

MIFLET. — Untersuchungen über die in der Luft suspendierten Bakterien. — Beitr. z. Biol. d. Pflanzan. III. Bd. 1879.

MIQUEL. — Études sur les poussières organisées de l'atmosphère. — Annuaire de l'observ. de Montsouris pour l'an 1879.

— Nouvelles recherches sur les poussières organ. de l'atmosphère. — Ann. de l'obs. Montsouris. 1880.

MIQUEL. — Étude générale sur les bactéries de l'atmosphère. — Extrait de l'annuaire de Montsouris. 1881.

— Études générales des bactéries de l'atmosphère. — Ann. de l'observ. Montsouris, 1882.

— Des organismes vivants de l'atmosphère Paris, 1883.

— Dixième mémoire sur les poussières organisées de l'air et des eaux. — Ann. de Montsouris pour 1888.

— De l'analyse microscopique de l'air au moyen de filtres solubles. — Ann. de micrographie. P. 153. Paris, 1889.

— Manuel pratique d'analyse bactériologique des eaux. Paris, 1891.

MITSCHERLICH. — Lehrbuch der Chemie. 1834.

NATHAN. — Die Bedeutung der Hefenreinzucht für die Obstweinbereitung. — Der Obstbau. Nr. 2. Stuttgart, 1891. Imprimé aussi dans Wittmacks Gartenflora. Berlin, 1891.

— Neuere Fortschritte auf dem Gebiete der Fruchtweinbereitung. — Der Obstbau. Nr. 3-4. Stuttgart, 1892.

NAEGELI. — Die niederen Pilze in ihren Beziehungen zu den Infektionskrankheiten. Munich, 1877.

— und LOEW. — Ueber die chemische Zusammensetzung der Hefe. — Sitzb. der bayer. Akad. d. Wissens., p. 161. 1878.

— Theorie der Gärung. 1879.

— Ueber die Bewegungen kleinster Körperchen. — Sitzb. d. math.-phys. Klasse d. Akad. d. Wissench. Munich, 1879.

— Untersuchungen über niedere Pilze. Munich, 1882.

NENCKI, M. — Die isomeren Milchsäuren als Erkennungsmittel einiger Spaltpilzarten. — Centralbl. f. Bakt und Parasitenkunde. IX. Bd. 1891.

NEUMAYER, JOH. — Untersuchungen über die Wirkung der verschiedenen Hefearten, welche bei der Bereitung weingeistiger Getränke vorkommen, auf den menschlichen und tierischen Organismus. — Inaug.-Diss. Munich, 1890.

NIELSEN, I. CHR. — Sur le développement des spores du Sacch. membranaefaciens, du Sacch. Ludwigii et du Sacch. anomalus. Compt. rend. des Meddel. fra Carlsb. Laborat. III B. 3 H. 1894.

OLSEN, JOHAN. — Er Sublimat i en Fortynding af 1 pro Mille et paalideligt Desinfektionsmiddel ? — Nyt Magasin for Læger, XIV. B. Christiania, 1884.

— Gjæring og Gjæringsorganismer. — Christiania, 1890.

PASTEUR, L. — Mémoire sur la fermentation appelée lactique. — Ann. de chim. et de phys. LII., p. 404. 1858.

— Mémoire sur la fermentation alcoolique. — Ann. de chimie et de phys. LVIII,. p. 359. 1860.

— Fermentation butyrique. Animalcules infusoires vivant sans oxygène libre et déterminant des fermentations. — Compt. rend., T. LII. 1861.

— Mémoire sur les corpuscules organisés qui existent en suspension dans l'atmosphère. Ann. de chimie et de phys. 3e Ser. T. LXIV. p. 12. 1862.

— Mémoire sur la fermentation acétique. — Ann. scientif. de l'Ecole normale supérieure. T. I. 1864.

— Études sur le vin. 1866.

— Études sur le vinaigre. 1868.

— Études sur la bière. 1876.

— Note sur la fermentation des fruits et sur la diffusion des germes des levures alcooliques. — Compt. rend. T. 83, P. 173. 1876.

— Examen critique d'un écrit posthume de Claude Bernard sur la fermentation alcoolique. — Lecture faite à l'Académie de Médecine, le 26 nov. 1876.

PEDERSEN, R. — Recherches sur quelques facteurs qui ont de l'influence sur la propagation de la levure basse du Sacch. cerevisiæ. — Compt. rend. des Meddel. fra Carlsb. Labor. I. Bd., I. H 1878.

— Sur l'influence que l'introduction de l'air atmosphérique dans le moût qui fermente, exerce sur la fermentation. — Compt. rend. des Meddel. fra Carlsb. Labor. I. Bd., I. H. 1878.

PETERSEN, A. — Einige Bemerkungen über das Lüften der

Würze. — Zeitschr. f. d. ges. Brauw. Munich, 1888.

Petersen. — Sarcina im Biere ohne irgend eine Krankheitserscheinung. — Zeitschr. f. d. ges. Brauw. Nr. 1. 1890.

Petri. — Zusammenfassender Bericht über Nachweis und Bestimmung der pflanzlichen Mikroorganismen in der Luft. — Centralbl. für Bakt. und Parasitenk II. Bd., Nr. 5, 6. 1887.

Pfund, Paul. — Theorie und Praxis der Schnellessigsfabrikation. Dingler's polyt. Journal. Bd. 211, p. 280, Jarhg. 1874.

Pichi, P. — Sopra l'azione dei sali di rame nel mosto di uva sul Saccharomyces ellipsoideus. — Nuova rassegna di viticoltura ed enologia. Fasc. Nr. 5. 1891.

— Ricerche morfologiche e fisiologiche sopra due nuove specie di Saccharomyces prossime al S. membranæfaciens di Hansen. — 1a memoria con 4 tav. Estr. d. Ann. d. R. S. di viticolt. Conegliano. Ser. III., An. I. Fasc. 2. 1892.

— Sulla fermentazione del mosto di uva con fermenti selezionati. Ibid. Ser. III., An. I. Fasc. 1. 1892.

— e Marescalchi. — Sulla ferm. del mosto di uva con fermenti selez. — Not. 2a Ibid. F. 3. 1892.

— Ricerche fisiopatologiche sulla vite in relazione al parassitismo della peronospora. — Ibid. Ser. III., Fasc. I. Ann. I. 1892.

Popoff. — Sur un bacille anaérobie de la fermentation panaire. — Ann. de l'Inst. Pasteur, p. 674. 1890.

Prazmowski. — Untersuchungen über die Entwickelungsgeschichte und Fermentwirkung einiger Bakterienarten (Clostridium butyricum). — Leipzic, 1880.

Prior. — Ueber die Erfahrungen beim Arbeiten mit Nürnberger Reinhefen. — Bayer. Brauer-Journal. Nuremberg, 1891.

Ratz, St. v. — Ueber die schleimige Milch. — Archiv. für Tierheilkunde, Bd. XVI. P. 87. 1890.

Raum, Joh. — Zur Morphologie und Biologie der Sprosspilze. — Zeitschr. f. Hygiene. X. Bd. 1891.

RAYMAN, B., und KRUIS, K. — Chemisch-biologische Studien (Saccharomyces und Mycoderma). — Prague 1891.

REESS. — Botan. Untersuchungen über die Alkoholgärungspilze. 1870.

— Ueber den Soorpilz. — Sitzungsber. der physikalisch-med. Sozietät Erlangen. Botan. Ztg. 1878.

REINKE. — Ueber Sarcina. — Wochenschr. f. Brauerei. 1885, 1886.

RICHET. — De la fermentation lactique du sucre de lait. — Compt. rend. LXXXVI. 1878.

— De quelques conditions de la fermentation lactique. — Compt. rend. LXXXVIII. 1879.

RIETSCH. — De la possibilité de communiquer divers bouquets aux vins par l'addition dans la cuve à fermentation de levures cultivées. — Bull. de la Société d'agriculture, séance 8 févr. 1890.

— et MARTINAND. — Des microorganismes que l'on rencontre sur les raisins mûrs et de leur développement pendant la fermentation. — Compt. rend. de l'Acad. d. sc. Paris. T. CXII.

ROMMIER, A. — Sur la possibilité de communiquer le bouquet d'un vin de qualité à un vin commun en changeant la levure qui la fait fermenter. — Bull. de la soc. chimique de Paris. Sér. III. Tom. II. 1889.

ROUX. — Sur une levure cellulaire qui ne sécrète pas de ferment invertif. — Bull. de la Soc. chim., XXXV., p. 371. 1881.

SALAMON, GORDON. — Cantor Lectures on Yeast. Londres, 1888.

SALKOWSKY. — Ueber Zuckerbildung und andere Fermentationen in der Hefe. — Z. f. phys. Chem. B. XIII. 1889.

SCHEELE, C. W. — Anmärkningar om sättet att conservera ättika. — Kungl. Vetenskaps-Academiens nya Handlingar. T. III., p. 120 Stockholm, 1782. — Aussi dans les Mémoires de Chimie. Dijon, 1785.

SCHIFFERER, A. — Uber die nichtkrystallisirbaren Produkte der Einwirkung der Diastase auf Stärke. — Inaug. Diss. Kiel. 1892.

SCHLEGEL, H. — Ein Versuch mit gezüchteter Weinhefe in der

Praxis. — Weinbau und Weinhandel. 9. Jahrg. Nr. 44, 1891.

SCHLOESING, Th. — Sur la fermentation en masses du tabac pour poudre. Mém. des Manufactures de l'État. T. II., Livr. 1. 1889.

SCHMITZ. — Resultate der Untersuchungen über die Zellkerne der Thallophyten. — Separat-Abdruck d. Sitzungsb. d. niederrhein. Ges. f. Natur-und Heilkunde. S. 18. Bonn, 1879.

SCHOLL, H. — Beiträge zur Kenntnis der Milchzersetzungen durch Mikroorganismen. — II: Ueber Milchsäure-gärung. Fortschr. d. Medicin, Nr. 2. 1890.

SCHRÖTER. — Ueber einige durch Bakterien gebildete Pigmente. — Cohns Beiträge z. Biologie der Pflanzen. I. Bd., 2. H. 1872.

SCHULZ, H. — Zur Lehre von der Arzneiwirkung. Virchow's. Archiv. Bd. 108. 1887.

SCHULZE, FR. — Lehrbuch der Chemie für Landwirte. — (II. Bd. 2. Abt. 1860.)

SCHUMACHER. — Beiträge zur Morphologie und Biologie der Hefe. — Sitzungsbericht d. K. K. Akad. d. Wiss. Vienne, 1874.

SCHUURMANS STECKHOVEN. — Saccharomyces Kefyr. — Inaug. Diss. Utrecht, 1891.

SCHÜTZENBERGER, F. — Les fermentations. Paris, 1879.

SCHWACHÖFER, F. — Ueber reingezüchtete Hefe. — Allgem. Zeitschr. f. Bierbrauerei und Malzfabrikation. p. 1040. Vienne, 1890.

— Beitrag zur Beurteilung des Wassers für die Zwecke der Brauerei und Mälzerei. — Mitt. d. Oesterr. Versuchsstation für Brauerei u. Mälzerei in Wien, Heft III. 1890.

SCHWANN. — Vorläufige Mitteilung betreffend Versuche über die Weingärung und Fäulnis — Poggend. Ann. XLI., p. 184. 1837.

SEYNES, J. de. — Sur le mycoderma vini. — Compt. rend. T. LXVII. 1868. Ann. d. sc. nat. Botanique V. Série X. 1869. Recherches sur les végétaux inférieurs, 3e fasc. Paris, 1885.

SOYKA. — Ueber den Uebergang von Spaltpilzen in die Luft. — Sitzungsber. der math.-phys. Klasse der Akademie der Wissensch. zu München. Bd. IX. 1879.]

STEINMETZ, O. — Neuerungen auf dem Gebiete der Essig-Industrie. Chem. Ztg. XVI Jahrg. p. 1723. 1892.

STENGLEIN. — Zusammenstellung der Erfahrungen mit Reinzuchthefe. — « Alkohol ». — Berlin, 1893.

STORCH, V. — Nogle Undersögelser over Flödens Syning. — 18. Beretn. fra den kgl. Veterinaer-og Landbobohöjsk. Laborat. Copenhague, 1890.

— Untersuchungen über Butterfehler und Säuerung des Rahmes. — Milchztg. 1890.

SUCHSLAND, E. — Ueber das Wesen der Tabakfermentation und über die sich daraus ergebende Möglichkeit, den Fermentationsprozess behufs Veredelung der Tabake zu beeinflussen. — Period. Mitteil. des Tabak-Vereins. Nr. 38. Mannheim, 1892.

THAUSING, J. — Einfluss der Hefegabe auf Hauptgärung, Hefe und Bier. — 14. Jahresbericht der ersten Oesterr. Brauerschule in Mödling, 1884.

— Ueber reingezüchtete Hefe. — Allg. Zeitschr. f. Bierbr. und Malzfabrik. S. 755. Vienne, 1885.

— Die Theorie und Praxis der Malzbereitung und Bierfabrikation. Leipsic, 1893.

— Ueber die Bildung des « Bruches » bei der Hauptgärung. — Brauer und Mälzer-Kalender. II. Teil. Stuttgart, 1889-90. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen, p. 61. Munich, 1890.

THOMSON, ROBERT D. — Ueber die Natur und die chemischen Wirkungen der Essigmutter. Ann. d. Chemie und Pharmacie. Bd. 83, p. 89. 1852.

TIEGHEM, PH., VAN. — Sur le Bacillus Amylobacter et son rôle dans la putréfaction des tissus végétaux. — Bull. de la Soc. bot. de France. 1877.

— et LE MONNIER. — Recherches sur les Mucorinées. — Ann. de sc. nat. Bot. 5. sér. T. XVII. 1873.

— Nouvelles recherches sur les Mucorinées. — Ann. de sc. nat. Bot. 6. sér. T. I. 1875.

TIEGHEM, PH., VAN. — Troisième mémoire sur les Mucorinées. — Ann. de sc. nat. Bot. 6. sér. T. IV. 1878.

— Leuconostoc mesenterioides. — Ann. de sc. nat. 6 sér. T. VII.

TOLLENS und STONE. — Ueber die Gärung der Galaktose. — Ber. d. d. chem. Ges. XXI, p. 1572. 1888.

TRAUBE. — Theorie der Fermentwirkungen. — Berlin, 1858. Ber. d. d. chem. Ges. 1874, 1876.

TULASNE. — Selecta fungorum carpologia. Paris, 1861.

TURPIN. — Mémoire sur la cause et les effets de la fermentation alcoolique et acéteuse. — Compt. rend. VII., p. 379. 1838.

TYNDALL. — Further researches on the deportment and vital persistence of putrefactive and infective organisms. Londres, 1877-78.

— Essays on the floating matter in the air in relation to putrefaction and infection. Londres, 1881.

UDRANSKY, L. — Studien über den Stoffwechsel der Bierhefe. — I. Beitr. zur Kenntniss der Bildung des Glycerins bei der alkoholischen Gärung. — Zeitschrift für physiologische Chemie. Bd. XIII. 1889.

UFFELMANN, J. Verdorbenes Brot. — Centralbl. f. Bakt. und Parasitenk. VIII. Bd. Nr. 16. 1890.

VELTEN. — Conférence. — Revue universelle de la brasserie et malterie. Nr. 742 et 743. 1888.

VERMISCHEFF. — Recherches sur les microbes acétifiants. Ann. de l'Inst. Pasteur, p. 213. 1893.

VUYLSTEKE. — Contribution à l'étude des Saccharomyces fermentant en concurrence. — Ann. de micrographie. — Ann. II., Nr. 5, 1889.

WEIGMANN, H. — Der Zweck und die Aufgaben der bakteriologischen Abteilung der milchwirtschaftlichen Versuchsstation in Kiel. — Milchzeitung, p. 793 u. 813. 1889.

— Ueber bittere Milch. — Milchzeitung Bd. XIX., p. 881 1890.

— Zur Säuerung des Rahmes mittelst Bakterienreinkulturen. — Landw. Woch. f. Schlesw.-Holst., Nr. 29. 1890.

WEIGMANN, H. — Neue Mitteilungen über Rahmsäuerung mittelst Reinkulturen von Säurebakterien. — Milchzeitung, Bd. XIX., p. 944. 1890.

— Erfahrungen über die Rahmsäuerung mit Bakterienreinkulturen. — Landw. Woch. f. Schlesw.-Holst., Nr. 16. 1892.

WICHMANN. H. — Die Hefereinkultur und die Bakterienfrage. — Mitteilungen der Oesterreichischen Versuchs-Station für Brauerei und Mälzerei in Wien. I. H. P. 64. 1888.

WICHMANN, H. und ROHN S. — Ueber Bierfiltration — Ibid. P. 79.

— Ueber Wasserfiltration. — Mitt. d. Oesterr. Vers. Stat. f. Brauerei und Mälzerei. V. Heft. Vienne, 1892.

— Biolog. Unters. d. Wassers f. Brauereizwecke. — Mitt. d. oest. V.-S. f. Br. u. Mälz. V. Heft. Vienne, 1892.

WIESNER. — Bedeutung der technischen Rohstofflehre (techn. Waarenkunde) als selbstständiger Disziplin und über deren Behandlung als Lehrgegenstand an techn. Hochschulen. — Dinglers polytechnisches Journal. Bd. 237. 1880.

— Untersuchungen über den Einfluss, welchen Zufuhr und Entziehung von Wasser auf die Hefezellen äussern. — Sitzb. der Wiener Akademie. Bd. 59. 1889.

WIJSMANN, H. P. — Ueber den Stickstoffgehalt von Saccharomyces ellipsoideus. Vortrag. Utrecht. — Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen, Nr. 17. 1891.

WILL, H. — Wie wird reine Hefe gezüchtet ? — Zeitschr. f. d. ges Brauwesen. Nr. 9. Munich, 1885.

— Ueber einige für die Brauindustrie wichtige Hefenarten und deren Unterscheidungsmerkmale. Allg. Brauer- und Hopfenztg. 1885. Festnummer.

— Ueber Sporen-und Kahmhautbildung bei Unterhefe. Zeitschr. f. d. ges. Brauw. Nr. 16. 1887.

— Ueber das natürliche Vorkommen von Sporenbildung in Brauereien. Z. f. d. ges. Brauw. Nr. 17. 1887.

— Untersuchungen über die Mikroorganismen der Tropfsäcke. Ber der Wiss. Stat. Munich, 1887.

— Ueber eine wilde Hefe. welche dem Biere emen bitteren

Geschmack giebt. Ber. d. wissensch. Stat. Munich, 1889.

— Beschreibung von zwei Krankheitshefen. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. Nr. 12. Munich, 1890.

— Zwei Hefearten, welche abnorme Veränderungen im Bier veranlassen. Zeitschr. f. d. ges Brauw. Nr. 7—8. Munich, 1891.

— Untersuchungen über die Verunreinigung gebrauchter Trubsäcke. Mitt. d. wissenschaftl. Station f. Brauerei. Munich. Zeitschr. f. d. g. Brauwesen. Nr. 9. 1892.

— Ueber die Wirkung einiger Desinfektionsmittel auf Hefe. Zeitschr. f. d. ges. Brauwesen. Nr. 17 et suiv., Munich. 1893.

Wilson. W. R. — Pure Yeast Culture in London. — « The Brewers'Journal, » p. 527. Londres, 1892.

Winogradsky. — Ueber die Wirkung äusserer Einflüsse auf die Entwickelung von Mycoderma vini. Bot. Centralbl. Bd. XX., S. 165. 1884.

Woodhead. — Bacteria and their Products. Londres, 1891.

Wortmann. — Untersuch. über das diastat. Ferment der Bakterien. — Zeitschr. für physiol. Chemie. Bd. VI. 1882.

— Einige. Bemerkungen über die Vergärung von Mosten mit reingezüchteter Hefe. Weinbau und Weinhandel N. 23. 1892.

— Weiteres über die Vergärung von Mosten mit reingezüchteten Hefen. Weinbau und Weinhandel. N. 42. 1892.

— Untersuchungen über reine Hefen. Landwirtschftl. Jahrb. Herausg. v. Thiel. p. 901. Berlin, 1892.

— Ueber die Anwendung von reingezüchteten Hefen bei der Schaumweinbereitung. Weinbau und Weinh. Nr. 30, 31. 1893.

— Ueber die Verwendung von reinen Weinhefen bei der Apfelweinbereitung. Weinb. und Weinh. Nr. 37. 1893.

— 1. Reinzüchtung verschiedener Rassen von Weinhefe. Versuche über die Gährthätigkeit derselben und ihre Anwendung in der Praxis. 2. Weitere

Gährversuche mit reingezüchteten Weinhefen. Dans le Bericht d. kgl. Lehranst. f. Obst - u. Weinbau zu Geisenheim a. Rh. Wiesbaden, 1893.

WURM, EMMANUEL. — Ueber Essigbildung mittels Bakterien. Dingler's polyt. Journal, Bd. 235. p. 225. Jahrg. 1880.

YUNG. — Des poussières organisées de l'atmosphère. — Arch. des sc. phys. et nat. T. IV. Genève, 1880.

ZALEWSKY. — Ueber Sporenbildung in Hefezellen. — Verh. d. Krakauer Akad. d. Wiss. Math.-naturw. Sektion I., Bd. XII. 1885. Ref. Bot. Centralbl. Bd. XXV.

ZEIDLER, A. — Beiträge zur Kentniss einiger in Würze und Bier vorkommenden Bakterien. — Wochenschr. f. Brauerei. 1890.

ZIMMERMANN. O. E. R. — Bakteriologische Diagnostik. — I. Teil. Chemnitz.

ZOPF, W. — Entwickelungsgeschichtl. Untersuchungen über Crenothrix polyspora. Berlin. 1879.

— Ueber den genetischen Zusammenhang der Spaltpilzformen. — Sitzb. d. Berl. Akad. d. Wiss. 1881.

— Zur Morphologie der Spaltpflanzen. Leipsic, 1882.

— Ueber Bacterium merismopedioides. — Sitzb. des bot. Ver. d. Prov. Brandenburg. Juni, 1882.

— Die Spaltpilze. Breslau. 3. Ausg., 1885.

— Oxalsäuregärung (an Stelle von Alkoholgärung) bei einem typischen (endosporen) Saccharomyceten, Sacch. Hansenii n. spec. — Bericht. d. d. botan. Gesellsch. Bd. VII., H. 2. 1889.

— Die Pilze in morphologischer, physiologischer, biologischer und systematischer Beziehung. — (Encyclopädie der Naturwiss. I. Abt. I. Teil. Handb. der Botanik, herausg. v. Schenk. Bd. IV. p. 271-781). Breslau, 1890. A paru aussi séparément.

— und LIESENBERG. — Ueber den sogenannten Froschlaichpilz (Leuconostoc) der europäischen Rübenzucker- und der javanischen Rohrzuckerfabriken. Beitr. zur Phys. und Morph. niederer Organismen, herausg. v. Zopf. Heft. I. Leipsic, 1892.

TABLE DES MATIÈRES

CHAPITRE PREMIER

Pages.

PRÉFACE. 1

RECHERCHES MICROSCOPIQUES ET PHYSIOLOGIQUES 3

1. — Préparations microscopiques. — Colorations et analyses microchimiques 3

2. — Études de morphologie et d'évolution à la table du microscope; chambres humides. 8

3. — Stérilisation (Spallanzani, Scheele, Appert, Schulze, Schwann, Schroeder, Dusch) 13

4. — Désinfection 18

5. — Ballons, Flacons et Récipients (Systèmes Pasteur, Chamberland, Freudenreich, Hansen et de Carlsberg . . . 22

6. — Milieux nourriciers 26

7. — Préparation de la culture pure 27

a. — Cultures pures pour les études du développement et pour les recherches morphologiques (Ehrenberg, Mitscherlich, Kützing, F. Schulze, Tulasne, De Bary, Brefeld). . . 28

b. — Cultures pures pour expériences physiologiques sur des cultures en masse (Pasteur, Cohn, Lister, Hansen, Schroeter, Koch). . . 29

a. — Méthodes physiologiques 30

b. — Méthodes de dilution. 33

8. — Détermination du nombre des cellules de levure . . . 39

CHAPITRE II

Analyses de l'air et de l'eau 43
Tyndall, Miquel. Koch, Hesse, Hueppe, v. Schlen, Frankland, Petri, Pasteur, Hansen. 43
Analyse zymotechnique de l'air et de l'eau de Hansen 56

CHAPITRE III

Les Bactéries 60
Formes. 61
Organisation anatomique, matières colorantes, bactéries luisantes, mouvement 62
Multiplication, formes de croissance, bactéries endospores et arthrospores, zooglées. 64
Anaérobies et aérobies. 66
1. — Bactéries acétiques 67
2. — Bactéries lactiques 72
3. — Bactéries butyriques. 78
4. — Organismes du Képhir 82
Ferment de la bière de gingembre. 84
5. — Bactéries visqueuses 86
6. — Bactéries à action intervertissante, diastatique et peptonisante 90
7. — Formes de Sarcina 91
8. — Crenothrix 94

CHAPITRE IV

Les moisissures. 96
Leur habitat et leur dissemination. 96
1. — *Botrytis cinerea* 98
2. — *Penicillium glaucum* 101
3. — *Eurotium Aspergillus glaucus*. 104
4. — *Aspergillus oryzæ* 108
5. — *Mucor*. 109

Mucor mucedo, racemosus, erectus, circinelloïdes, spinosus, stolonifer 109

Action fermentative des mucorinées. 115

6. — *Monilia*. 117

7. — *Oïdium lactis*. 120

8. — *Fusarium* 123

9. — *Chalara Mycoderma* 124

10. — *Dematium pullulans* 125

11. — *Cladoporium herbarum* 127

CHAPITRE V

LES FERMENTS ALCOOLIQUES 129

Introduction 129

Remarques générales 129

Observations antérieures de Schwann, De Seynes, Reess, De Bary, Engel et Brefeld 130

Pasteur et ses devanciers 131

Opinions de Pasteur sur les organismes de la fermentation, sa théorie de la fermentation et sa polémique avec Brefeld et Traube 132

Essais d'aération de Pedersen, Hansen et Buchner 138

Critique de Nägeli, Brown et Hueppe de la théorie de la fermentation de Pasteur, Théorie de Nägeli 138

Observations de Bail, Reess, Zopf et Brefeld sur des champignons bourgeonnants 140

Analyses chimiques de Rayman et Kruis 140

Recherches de Hansen. 142

Remarques générales. 142

1. — Préparation de la culture pure 142

2. — L'analyse 144

a. — Image microscopique de la levure déposée. . 145

b. — La formation des ascospores 146

c. — La formation des voiles 160

d. — Les limites des températures pour les espèces de *Saccharomyces* 166

e. — Culture sur milieu nourricier solide 168

f. — Action des *Saccharomyces* et des levures ressemblant aux *Saccharomyces* sur les sucres et autres constituants du liquide nourricier. Maladies de la bière 169

g. — Des variations dans les différentes espèces de *Saccharomyces* 177

h. — Formation mucilagineuse des levures 182

Image microscopique d'une cellule de levure 184

Classification systématique du genre des *Saccharomyces* . . 186

Saccharomyces cerevisiæ I, Hansen. 187

Saccharomyces Pastorianus I, Hansen 190

Saccharomyces Pastorianus II, Hansen 192

Saccharomyces Pastorianus III, Hansen 195

Saccharomyces ellipsoideus I, Hansen 198

Saccharomyces ellipsoideus II, Hansen 199

Deux autres levures ellipsoïdales, Will 202

Saccharomyces Ilicis, Grönlund. 203

Saccharomyces Aquifolii, Grönlund 203

Saccharomyces pyriformis, Marshall Ward 204

Saccharomyces Marxianus, Hansen 204

Saccharomyces exiguus (Reess), Hansen 205

Saccharomyces Joergensenii, Laschè 206

Saccharomyces membranæfaciens, Hansen. 207

Saccharomyces Hansenii, Zopf 208

Saccharomyces Ludwigii, Hansen. 208

Saccharomyces acidi lactici, Grotenfelt 210

Saccharomyces minor Engel 210

Saccharomyces anomalus. Hansen 211

Saccharomyces conglomeratus, Reess 213

Levure basse n° I et n° II de Carlsberg 214

Groupement des races de levure de culture au point de vue pratique 217

Observations de Irmisch 218

Levures de distillerie, levures pressées (Delbrück, Lindner, Stenglein, Bélohoubek, Schumacher et Wiesner) . . . 219

Autres champignons bourgeonnants 220

Torula 221

Saccharomyces apiculatus 228

Mycoderma cerevisiæ et *vini* 235

CHAPITRE IV

L'APPLICATION PRATIQUE DES RÉSULTATS DES RECHERCHES SCIENTIFIQUES. 239
— Technique de la stérilisation développée par les anciennes recherches sur la génération spontanée. — Conséquences pratiques de ces recherches. Spallanzani, Scheele, Appert, Schulze, Schwann, Schröder, Dusch ; résultats de Pasteur 239

Système Hansen et réforme qui en résulte. — Maladies dans la bière ; différentes espèces de *Saccharomyces cerevisiæ* ; culture pure de la levure de brasserie ; constance des caractères des différentes espèces de levures dans la pratique ; méthode pour l'analyse pratique de la levure ; appareils de propagation pour la levure ; ballons servant à l'expédition de la levure ; conservation de la culture pure . . 241

Rapports sur les résultats obtenus par les recherches de Hansen (Lintner, Aubry, Will, Reinke, Bêlohoubek, Bungener, Lintner fils, Frankland, Mac Cartie, De Bary, Wilson, Kokosinski, Van Laer, etc.). 253

RÉSUMÉ 265

BIBLIOGRAPHIE 267

TABLE DES MATIÈRES 303

TABLE ALPHABÉTIQUE 309

TABLE ALPHABETIQUE

A

Acétique (Fermentation)..... 67
Acétiques (Bactéries)..... 67
Acide fluorhydrique..... 22,32
— tartrique..... 31,32
Action fermentative des mucorinées..... 115
Adametz..... 78,225
Aérobies..... 66,136
Aéroscope..... 45
Air (Analyses de l') et de l'eau.. 43
Air (Analyse de l'), d'après Koch et Hesse..... 48
Air (Analyse de l'), d'après Miquel..... 49
Air (Analyse zymotechnique de l'), d'après Hansen..... 50,56
Air (Filtration de l')..... 49
— (Stérilisation de l')..... 13
Alcooliques (Ferments)..... 129
Amidon (Bacille dissolvant de). 90
Amthor (Recherches de)..... 175,177
Anaérobies..... 66,136
nalyse de l'air et de l'eau..... 43
— de la bière dans l'appareil de propagation.. 159
— de la levure de brasserie, d'après Hansen..... 158
Analyse Méthodes de Hansen... 144
— (Prise des échantillons dans les cuves pour l')..... 159
Anatomique (Organisation) des bactéries..... 62
Appareil de propagation, Hansen et Kühle..... 246
— de propagation, Bergh et Joergensen..... 248
— (Analyse de la bière dans l')..... 159
Appert..... 13,241
Application pratique des résultats des recherches scientifiques..... 239
Arthrospores (Bactéries)..... 65
Ascospores (Bourgeonnement des)..... 149
— (Formation des).. 146
— (Germination des) 149
— (Limites de la température pour la formation des).. 153
— (Lois pour la formation des).... 146
— (Organisation anatomique des)... 148
Aspergillus Oryzæ..... 108
Aubry (Sur la levure pure)..... 254

B

Bacille à action peptonisante... 91
— de la tuberculose (Coloration du)..... ... 5
— dissolvant l'amidon..... 90
Bacillus butyricus..... 79
— **ethaceticus**..... 72
Bactéries..... 60
— B. aceti 68
— acétiques..... 67
— arthrospores..... 65
— avec action intervertissante..... 90
— avec ferments dissolvant l'amidon..... 90
avec ferments peptonisants..... 90
— diastatiques et peptonisante..... 90
— (Coloration des) 5
— endospores..... 65
— (Formes de croissance des)..... 61
— (Formes d'involution des)..... 62
— (Formation de zooglées des) 66
Bactérie lactique de Peters.... 75
— — Qvist..... 77
— — Storch.... 77
Bactéries (Multiplication des). 64
— (Organisation anatomique des) 62
— B. aceti et Pasteurianum 68
— visqueuses 86
Bactérium vermiforme..... 85
Bail..... 113,140
Ballons à vide 45
— de Carlsberg..... 25
— Chamberland 24
— Freudenreich..... 24
— Hansen 25
Ballons Pasteur 23
— pour expédier de petites et grandes cultures..... 250
Bary (De)..... 29,83,125
Bavay (sur la levure pure)..... 262
Bélohoubek..... 256
Bibliographie..... 267
Bière (Filtration de la)..... 15
— de gingembre..... 84
Biernacki 22
Bœttcher (Chambre humide de). 11
Borgmann (Recherches de).... 174
Botrytis cinerea..... 98
Boulangerie (Levain de)..... 210
Bourgeonnement des spores chez les Saccharomyces... 149
Bourquelot..... 73,109
Brefeld..... 140
Buchner (Essais d'aération de). 138
Bungener (sur la levure pure). 259
Burton (Levure de)..... 262
Butyriques (Ferments)..... 79

C

Cagniard-Latour..... 13,131
Carlsberg (Ballons de)..... 25
— (Brasseries de..... 214
— (Levure basse n° 1 et n° 2 de)..... 214
Cartie Mac (sur la levure pure). 262
Caséeuse (Levure) 180
Caves de Fermentation (Analyse de l'air des), par Hansen.. 55
Cellulose (Fermentation de la) . 82
Chalara Mycoderma..... 124
Chamberland (Flacons)..... 24
Chambre humide de Boettcher. 11
— de Ranvier.. 10
Champignons bourgeonnants (autres espèces non classées). 220

Champignons de la fermentation de la dextrane..... 89
Champignons bourgeonnants (La formation gélatineuse chez des) 183
Chaux (Bisulfite de) 21
— (Chlorure de), pour désinfecter..... 21
Chevreul..... 23
Chlorure de chaux, pour désinfecter..... 21
Cienkowsky..... 124
Cladosporium herbarum.... 127
Classification systématique du genre Saccharomyces..... 186
Cloisons (Formation de)..... 149
Clostridium butyricum..... 79
Cohn..... 60
Coloration (Méthode de)..... 4
— (Méthode de) du bacille de la tuberculose 5
Comptage des cellules de la levure..... 39
Conservation de la culture pure..... 251
Contrôle de la levure en pratique..... 158
Crenothrix Kühniana..... 94
Croissances (Formes de) des bactéries 61
Culture des Saccharomyces sur milieux nourriciers solides 168
— (Essais de)..... 3
— fractionnée 34
Cultures en masse (Cultures pures pour expériences physiologiques avec des)..... 29
Culture pure (Conservation de la)..... 251
— Méthodes de Hansen. 34,38
— Méthode de Koch . . 36
— Méthodes de Pasteur. 30,34
— Préparation de la) . 34,38,142
Cultures pures (Expédition des) 250
— pour les études du développement et pour les recherches morphologiques..... 28
— pures, pour expériences physiologiques sur des cultures en masse..... 29
Cultures sur gélatine de Hansen. 37
— — de Koch.. 36
— sur plaques (Détermination des erreurs dans l'emploi des) . . 38

D

De Bavay..... 262
Delbrück..... 75,219
Dematium pullulans..... 125
Désinfection..... 18
Dessiccation (Méthode de).... 4
Développements gemmiformes 113
Dextrane (Champignons de la fermentation de la) 89
Dilution (Méthodes de)..... 33
Dispora caucasica..... 83
Distillérie (Levure de)..... 219
Drêches (Analyse de l'air près des), par Hansen . . 54
— (Appareils pour sécher les) 55
Duclaux.....66,76,134
Durst..... 40

E

Eau (Analyses de l'air et de l'). . 43
— (Analyse zymotechnique de l') d'après Hansen 50,56
Endomyces decipiens..... 152
Endospores, Bactéries..... 65
Engel..... 130

Essais de culture..... 3
Eurotium Aspergillus glaucus 104
Expédition de la levure dans des ballons appropriés.... 259

F

Fermentation acétique..... 67
— alcoolique..... 129
— butyrique..... 78
— de la cellulose.. 82
— du Képhir..... 82
— du tabac..... 266
— du vin de riz... 108
— lactique..... 72
— panaire..... 210
— visqueuse..... 86
— basse (Levure de) 217
— haute (Levure de) 218
Ferment de la bière de gingembre..... 84
Ferments acétiques..... 67
— alcooliques..... 129
— butyriques..... 78
— lactiques..... 72
Filtrage de la bière..... 15
Filtration de l'air..... 49
Fitz.....33,81,101
Fluorhydrique (Acide)..... 22,32
Formation de cloisons..... 149
— de voiles..... 160
— gélatineuse chez des champignons bourgeonnants..... 183
Formes de croissance des bactéries..... 61
— d'involution des bactéries..... 62
Forti..... 265
Fractionnée (Culture)..... 33
— (Stérilisation)..... 17
Frai de Grenouilles..... 89
Frankland (Filtre)..... 49
— (sur la levure pure). 260
Fresenius..... 122
Freudenreich (Flacons)..... 24
Fumago..... 128
Fusarium graminearum..... 123

G

Gélatine (Cultures sur) de Hansen..... 37
— (Cultures sur) de Koch..... 36
Gélatineuse (Formation) chez des Champignons bourgeonnants..... 183
Gemmes (Formation de)..... 113
Génération spontanée..... 13,239
Germoirs (Analyse de l'air des), par Hansen..... 55
Gimgembre (Bière de)..... 84
Glycérine (Proportion de) dans les produits de la fermentation de différents Saccharomyces..... 175
Gomme des sucreries..... 89
Grönlund..... 170,202,224,237
Grotenfelt..... 76,84,174,210
Groupement des races de levures au point de vue pratique..... 217
Gruber..... 20,81
Gruber (Bactérie butyrique de) 81
Guillebeau..... 78

H

Hansen (Analyse de l'air, d'après) 56
— (Analyse de l'eau d'après) 56
— (Analyse de la levure de brasserie, d'après).... 158
— (Analyses d'air de)..... 50

Hansen et Kühle (Appareil de propagation pour la levure de) 246
Hansen (Bactéries acétiques de) 68
— (Comptage des cellules de levure, d'après).... 39
— (Cultures des Saccharomyces sur milieux nourriciers solides de). 168
— (Espèces de Saccharomyces, d'après)..... 187
— (Essais d'aération de)... 138
— (Examen de) des cultures sur plaques de Koch..... 38
— (Flacon de)..... 25
— (Méthodes analytiques de). 144
— (Méthode de) pour l'analyse zymotechnique de l'air et de l'eau..... 56
— Préparation de la culture pure..... 34-38
— (Recherches de) faites dans la pratique de l'industrie de la fermentation..... 246
— (Recherches sur la levure de)..... 142
— (Réforme de) dans la fermentation industrielle. 241
Hayduck. 40
Hématimètre..... 49
Hesse..... 48
Hoffmann..... 23
Holm (Examen par) des cultures sur plaques de Koch..... 39
Holm et Poulsen, (Recherches de)..... 158
Hueppe 49,74,76,81,139

I

Introduction aux Ferments alcooliques..... 129
Involution (Formes d') des bactéries..... 62
Iomaltose..... 174

J

Jaquemin..... 177
Jensen..... 78
Joergensen 259,264

K

Kayser..... 167,174,265
Képhir..... 82
Kern..... 82
Koch..... 5.17,20,36
Kokosinski (Sur la levure pure de fermentation haute)..... 263
Krüis 140
Kukla 237
Kützing 67

L

Lactique (Fermentation)..... 72
— (Levure) 210,225
Lactiques (Bactéries)..... 72
Lactose (Champignons bourgeonnants fermentant la).... 210.225
Lait (Maladies dans le). 77
v. **Laer** (Sur la levure pure de fermentation haute) 264
Laschè 206,237
Lechartier..... 135
Leuconostoc mesenterioides.. 89
Levain de boulangerie..... 210
Levure (Analyse de la)..... 144
— (Appareil de propagation pour la) de Hansen et Kühle..... 246
— (Appareil de propagation pour la) de Bergh et Joergensen..... 248

Levure Ascospores..... 147
— basse..... 217
— cascéuse..... 180
— cloisons..... 149
— (Comptage des cellules de) 39
— (Culture de la), d'après la méthode de Hausen.. 34-38
— (Culture de la), d'après la méthode de Pasteur..... 30,34
— (Culture de la) en pratique 246
— (Culture de) sur milieu nourricier solide. 168
— de bière de gingembre.. 84
— de Burton 262
— de dépôt 145
— de distillerie 219
— de l'acide lactique..... 210
— (Espèces de) employées en pratique..... 217
— fermentant le sucre de lait..... 210,225
— (Formation des ascospores chez les)..... 146
— (Formation de cloisons dans les cellules de).. 149
— (Formation de voiles de la)..... 160
— (Formation d'un réseau de)..... 143
— haute..... 218
— Image microscopique de la cellule de)..... 184
— (Maladies dans la bière, provoquées par des). 134,170,190 195,199,242
— pressée 219
— (Propriétés pratiques des différentes espèces de). 217
— (réseau)..... 143
— sphérique ou de mucor. 113
Levure (Traitement de la) avec l'acide fluorhydrique. 32
— (Variétés de)..... 179
— (Voiles)..... 160
— de brasserie (Analyse pratique de la)..... 158
— déposée (Image microscopique de la)..... 145
— de vin (Recherches de Marx, Amthor, etc) . . 177
Liebig..... 132,139
Limites de la température pour les espèces de Saccharomyces. 166
Lindner.. 75,92
Lintner C. (Sur la levure pure). 253
Lintner C. J. (Sur la levure pure) 260
Lister. 33

M

Mac-Cartie (Sur la levure pure) 262
Mach 265
Maladies dans la bière, provoquées par de la levure 134,170,190,195-199,242
— dans le lait 77
Marshall Ward..... 84
Martinand 177
Marx (Sur la levure de vin).... 176
Mélanges d'espèces de Saccharomyces..... 159
— de levures de brasserie..... 243
Membranes ou voiles mycodermiques..... 160
Métairie..... 77
Méthode de coloration..... 4
— de dessiccation..... 4
Microchimiques, Analyses.... 7
— Réactifs 7

Micrococcus prodigiosus.... 75
Microcoques..... 61
Microorganismes de l'air et de l'eau..... 43
Microorganismes (Action de désinfectants sur les)..... 18
Microscope..... 3
Microscopique (Image) de la levure déposée..... 145
Microscopiques (Préparations). 4
— (Recherches) et physiologiques 3
Milieux nourriciers..... 26
Milieu solide (Culture des Saccharomyces sur un)..... 168
Miquel (Analyse de l'air, d'après) 49
— (Contrôle des cultures sur plaques de Koch, par)..... 38
Mitscherlich..... 28
Moisissures..... 96
Monilia candida..... 117
Moût stérile introduit dans les cuves..... 17
Mucor (Action des) sur les sucres)..... 115
— (Action fermentative des espèces de)..... 115
— circinelloïdes..... 113
— erectus..... 113
— (Levure de)..... 113
— mucedo..... 109
— racemosus..... 112
— spinosus..... 116
— stolonifer..... 115
Müller-Thurgau..... 265
Multiplication des bactéries... 64
— (Pouvoir de) des cellules de levure..... 3[illegible]
Micoderma cerevisiæ et vini . 235

N

Nägeli (Théorie de la fermentation de)..... 139
Nathan..... 177,265
Noyau cellulaire..... 186

O

Oidium lactis..... 120
Organisation anatomique des bactéries..... 62
Orléans (Méthode d')..... 68

P

Panaire (Fermentation)..... 210
Panum..... 40
Pasteur..... 30,34,44,67,131,240
— (Bactéries acétiques de) 67
— (Ballons)..... 23
— (Étude sur la bière de) . 131
— (Résultats pratiques de) 240
— (Théorie de la fermentation de)..... 135
Pasteurisation de la bière.... 16
Pedersen (Essai d'aération de).. 138
Pediococcus acidi lactici..... 91
— cerevisiæ..... 93
— produisant le filage de la bière blanche..... 86
Penicillium glaucum..... 101
Peptonisante (Bacille à action). 91
Peste des puits..... 94
Peters (Bactérie d'acide lactique de)..... 75
Petersen (Sarcina)..... 94
Petri (Filtre)..... 49

Physiologiques (Recherches microscopiques et)..... 3
Plaques (Méthodes des cultures sur). Détermination des erreurs..... 38
Portele..... 265
Pratique (Application des résultats des recherches scientifique dans la)..... 239
Pratique (Contrôle de la levure en)..... 158
Préparations microscopiques.. 4
Pressee (Levure)..... 219
Prise des echantillons dans la cuve à fermentation..... 159
Produits de la fermentation (Analyse chimique de)..... 174
Propagation (Appareils de) de Bergh et Joergensen..... 248
Propagation (Appareils de) de Hansen et Kühle..... 246
Propagat'on (Analyse de la bière dans l'appareil) de.. 159

Q

Qvist (Bactérie d'acide lactique de..... 77

R

Ranvier (Chambre humide de). 10
Raymann et **Kruis** (Analyses de bière)..... 140
Raum..... 185
Réactifs microchimiques..... 7
Recherches de Hansen..... 142
— — faites dans la pratique de l'industrie de la fermentation..... 245
Recherches microscopiques et physiologiques..... 3
Reess..... 101,130,140
Refroidissement du moût.... 17
Reinke (Sur la levure pure)... 256
Réseau gélatineux..... 183
Résistance (Force de), des différentes espèces de levure. 166
Rhizopus nigricans..... 115
Rietsch..... 177
Rommier..... 177

S

Saccharobacillus Pastorianus.. 76
Saccharomyces acidi lactici.. 210
— anomalus..... 211
— apiculatus.... 228
— Aquifolii..... 203
— cerevisiae I.... 177,214
— conglomeratus. 213
— ellipsoideus I.. 198
— ellipsoideus II. 199
— exiguus..... 205
— Hansenii..... 208
— Joergensenii.. 206
— Ilicis..... 20 :
— Kephyr..... 227
— Ludwigii..... 208
— Marxianus.... 204
— membranæfaciens..... 207
— minor..... 210
— Pastorianus I.. 190
— Pastorianus II. 192
— Pastorianus III. 195
— pyriformis.... 204
— Tyrocola..... 227
— (Action des), sur les sucres et autres constituants du liquide nourricier..... 169
— Analyse..... 144

Saccharomyces (Classification systematique des) 186
— (Culture pure des)..... 34-38
— (Culture sur milieu nourricier solide) 168
— (Description de la cellule des). 184
— Formation des ascospores... 146
— Formation des voiles..... 160
— Germination des spores... 149
— Image microscopique de la levure déposée 145
— (Les limites de la température pour les)..... 166
— (Maladies dans la bière, provoquées par des). 134,170, 190,193,193,242
— Variations chez les espèces... 179
Saccharose (Solution de)..... 251
Sacs à trouble (Nettoyage des). 21
Sake..... 108
Sarcina (Formes de)..... 91
Scheele 13,239
Schlen..... 49
Schulze, F 13
Schwann..... 13,240
Sclerotium 100
Solution de soude pour nettoyage 21
Spallanzani..... 13,239
Spores (Bourgeonnement des).. 149
— (Constitution des).... 147
— (Germination des).... 149
— (Limite de la température pour la formation des)..... 153
Spores (Lois pour la formation des)..... 146
Spore durable des bactéries.. 65
Sporulation 146
— (Limites de la température pour la)..... 153
— (Lois pour la)..... 146
Stahl..... 132
Stérilisation..... 13
— de l'air..... 18
— de liquides nourriciers et de milieux nutritifs solides 15
— d'objets en verre et en métal 14
— fractionnée..... 17
Storch (Bactérie d'acide lactique de)..... 77
Sublimé (Désinfection par le)... 20
Sucres (Action des mucorinées sur les)..... 115
— (Aperçu de l'action des Saccharomyces, etc., sur les)..... 169

T

Tabac (Fermentation du)..... 266
Tartrique (Acide)..... 31
Température (Limite de la) pour les espèces de Saccharomyces..... 166
Théorie de la fermentation de Brefeld..... 135
— de la fermentation de Brown 138
— de la fermentation de Nägeli..... 139
— de la fermentation de Pasteur..... 135
— de la fermentation de Traube..... 135

Torula 221
Trauhe 135
Tuberculose (Coloration du bacille de la) 5
Turpin 67,131

V

Variétés chez les espèces de Saccharomyces 177
Velten 134
Vin de fruit (Fermentation du). 265
Vinaigrerie rapide 68
Vin (Levure de), Recherches de Marx, Amthor, etc 176
Visqueuse (Fermentation) 86
Visqueuses (Bactéries) 86
Voiles ou membranes mycodermiques 160
— (Formation de) 160
Vuylsteke, Mélanges d'espèces de Saccharomyces effectués par 159

W

Weigmann 78
Will 21,170,202,255
Winogradsky 238
Worstmann 90,177,265

Z

Zooglées, (Formation de) des bactéries 66
Zopf 75,128,140.208
Zygospores 112

FIN

CHATEAUROUX. — IMP. LANGLOIS ET Cie.